



**Carlos Manuel Dias
Silva**

**Melhoramento de métodos de controlo da amêijoa
asiática *Corbicula fluminea***



**Carlos Manuel Dias
Silva**

**Melhoramento de métodos da amêijoia asiática
*Corbicula fluminea***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Joana Luísa Pereira, Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, do Doutor Bruno Nunes, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e do Professor Doutor Fernando Gonçalves, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi financiado por fundos europeus através do COMPETE e por fundos nacionais através da FCT, no âmbito do projeto PTDC/AAC-AMB/113515/2009.

o júri

presidente

Professor Doutor Carlos Miguel Miguez Barroso
Professor Auxiliar, Departamento de Ambiente, Universidade de Aveiro

Doutor Nelson José Cabaços Abrantes
Investigador em Pós-Doutoramento, Departamento de Ambiente, Universidade de Aveiro

Doutora Joana Luísa Lourenço Estevinho Pereira
Investigadora em Pós-Doutoramento, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

agradecimentos

No final de uma importante etapa, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram durante todo o processo, sem eles tudo teria sido mais difícil.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores Doutora Joana Pereira, Doutor Bruno Nunes e Professor Doutor Fernando Gonçalves, pelo profissionalismo e dedicação demonstrados ao longo de todo o processo, gostaria ainda de agradecer a confiança que em mim depositaram e a liberdade que me foi dada ao longo de todo o trabalho.

Um agradecimento muito especial a minha família que sempre acreditou em mim e aos amigos que me apoiaram incondicionalmente durante este processo, e cujo apoio foi fundamental.

Gostaria ainda de agradecer ao Professor Doutor António Nogueira pela cedência do modelo de cálculo do efeito tóxico de misturas, e pela disponibilidade na ajuda da interpretação dos resultados

A todos os membros do LEADER por toda a ajuda prestada, pelo companheirismo e bom ambiente de trabalho que proporcionaram.

palavras-chave

Amêijoia asiática, *Corbicula fluminea*, bioincrustação, sinergismo, Colinesterases, dimetoato, diclorvos, SDS, cobre.

resumo

O bivalve de água doce invasor *Corbicula fluminea*, comumente designado de amêijoia asiática, é capaz de provocar alterações em aspetos vitais do funcionamento de ecossistemas, e prejuízos económicos severos por danos causados pela sua atividade incrustante em empresas hidrodependentes. Devido à crescente dispersão das infestações e às extensivas perdas económicas associadas, o melhoramento das técnicas de controlo é uma tarefa necessária. Uma vez que os métodos de controlo mais comuns se baseiam na aplicação de biocidas químicos, melhoramentos quer ao nível da eficácia quer da diminuição dos impactos ambientais associados à sua aplicação são fundamentais. A combinação de vários agentes biocidas resultando em sinergismo toxicológico, é uma das abordagens que permite que se reduzam as concentrações de cada um dos compostos usados no tratamento, ainda assim mantendo níveis satisfatórios de eficácia. Não obstante as vantagens da utilização de tratamentos combinados, a avaliação dos seus efeitos biocidas em bivalves (que precede naturalmente a aplicação em larga escala) é um processo logisticamente muito exigente dado o elevado número de combinações que é necessário considerar para que a análise produza resultados fidedignos. Este trabalho explorou a possibilidade de utilizar metodologias alternativas (logisticamente menos exigentes e na prática mais céleres) aos ensaios de mortalidade para avaliar a capacidade biocida de combinações binárias de agentes potenciais de controlo da amêijoia asiática: ensaios de toxicidade *in vitro*. Com este enquadramento presente, selecionaram-se quatro compostos modelo com potencial biocida relativamente à amêijoia asiática e sobre os quais havia muita informação toxicológica disponível: cobre, dimetoato, diclorvos e dodecil sulfato de sódio (SDS). A escolha destes compostos teve ainda em conta a capacidade que todos apresentam de inibir ChEs (um parâmetro que pode ser fidedignamente determinado *in vitro*), o que é um fator importante se considerarmos que a mortalidade causada pelos compostos pode ser explicada pela (ou pelo menos relacionada com a) inibição de ChEs.

Numa fase inicial, a capacidade biocida de cada um dos compostos per se foi testada. Os resultados destes ensaios de mortalidade apoiaram a definição das gamas de concentração que foram utilizadas em testes subsequentes para avaliação da inibição de ChEs de homogeneizados de *C. fluminea* expostos *in vitro* a cada um dos compostos individualmente. Os resultados evidenciaram que estes compostos possuem de facto capacidade para inibir *in vitro* as colinesterases de *C. fluminea*. De seguida, foram efetuadas exposições *in vitro* de homogeneizados de *C. fluminea* a combinações binárias dos compostos (cobre e dimetoato; diclorvos e SDS), determinando os seus efeitos sobre a atividade das ChEs. O ajuste dos dados experimentais obtidos aos modelos de adição de concentração (CA; Concentration Addition) e de ação independente (IA; Independent Action), que explicam no geral a toxicidade de misturas de

químicos, permitiu concluir que ocorre um comportamento sinérgico dos químicos quando combinados, em particular a baixas doses no caso da combinação de cobre com dimetoato, e fundamentalmente devido ao diclorvos na combinação de diclorvos com SDS.

A capacidade desta metodologia alternativa, enquanto substituto dos ensaios de mortalidade, para testar combinações de agentes de controlo de *C. fluminea*, foi avaliada numa última fase: foram então realizados ensaios de mortalidade, em que os organismos foram expostos a concentrações criteriosamente selecionadas, com base nos dados obtidos nos ensaios anteriores. Os resultados evidenciaram a existência de uma relação entre a capacidade de inibição de ChEs de uma mistura e a mortalidade causada por uma mistura equivalente. O comportamento sinérgico dos componentes em mistura relativamente à capacidade de inibição das ChEs traduziu-se, na generalidade dos casos, numa tendência para efeitos mais do que aditivos relativamente à mortalidade.

A possibilidade de se prever a letalidade, e consequentemente o potencial biocida, de uma mistura com base nos resultados obtidos em ensaios *in vitro* é evidenciada pelos dados obtidos no presente trabalho, apresentando-se por isso a utilização do biomarcador atividade de ChEs como uma forma rápida de avaliar o potencial biocida de misturas de compostos com propriedades anticolinesterásicas. Esta evidência abre caminho para a procura de ensaios alternativos adequados a outro tipo de químicos de controlo, facilitando a otimização de tratamentos combinados para aplicação no controlo de pestes no geral e/ou no controlo de bivalves incrustantes em particular.

keywords

Asian Clam *Corbicula fluminea*, biofouling, synergism, Cholinesterases, dimethoate, dichlorvos, SDS, copper.

abstract

The freshwater bivalve *Corbicula fluminea* has been increasing its distribution outside its native range, being currently considered one of the worst 100 invasive species. This species is capable of operating changes in key aspects of ecosystems functioning and severe economic damages as a biofouler in water-dependent industries. Due to the increasing spread of the infestations and the extensive economic losses associated, the improvement of available control methods is still an up-to-date challenge. Since common control methods rely on the application of chemical biocides, improvements regarding both efficacy and ecological friendliness are much required. The combination of different biocides that may result in toxicological synergism is one of the approaches that would allow the reduction of the concentrations of each chemical used for the treatment, and still achieve satisfactory levels of biocidal efficacy. Bearing this rationale in mind, we selected four biocides already proven efficient against the Asian clam as study models: copper, dimethoate, dichlorvos and sodium dodecyl sulphate (SDS) as chemical models. There is a wide body of knowledge on the toxicity of these compounds to the aquatic biota and the selection was also favored by the capability that all have of inhibiting ChEs. This latter was an important criterion given that mortality (the endpoint of interest here) can be linked (or partly related) to ChEs, inhibition.

In a first stage, the individual biocidal potency of each chemical was tested. The results of these mortality tests were then used to define the concentration ranges to expose whole *C. fluminea* homogenates *in vitro* to each of the chemicals individually. The data yield showed that all chemicals can in fact act as ChEs inhibitors in *C. fluminea*. Then, a second set of *in vitro* exposures was made, now with binary mixtures of the chemicals (copper and dimethoate; dichlorvos and SDS) to determine their effects on the ChE activity. The fitting of the experimental data to the CA (Concentration Addition) and IA (Independent Action) models of mixtures toxicity highlighted the occurrence of a synergistic behavior of the chemicals as combined; especially at low doses in the case of the copper/dimethoate combination, and essentially due to the presence of dichlorvos in the dichlorvos/SDS combination.

The potential of this alternative methodology, as a surrogate for mortality tests for testing combinations of control agents against *C. fluminea* was evaluated in a last stage: another mortality testing trial was made exposing the organisms to judiciously-selected treatments taking into account the data yield from previous assays. The results evidenced a relationship between the degree of inhibition of ChEs activity induced by a given mixture and the mortality caused by the exposure to an equivalent mixture. The synergic behavior of the components of a mixture showing ability to inhibit ChEs translated into a tendency for a greater than additive behavior in terms of mortality.

The possibility of predicting the lethality and the associated biocidal potential of

a mixture based in the results obtained in *in vitro* tests is highlighted by the data obtained in the present study. This allows the use of the biomarker 'ChEs activity' as a quick way of assessing the biocidal potential of mixtures of compounds with anticholinesterasic properties. This evidence constitutes a promoter of the search for testing surrogates adequately fitting the chemical classes involved, thus facilitating the optimization of combined treatments for use as improved control methods against pests in general and/or against macrofouling bivalves in particular.

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 2 |
| 1.1 Caracterização biológica da espécie | 4 |
| 1.1.1 Morfologia e ciclo de vida | 4 |
| 1.3 Impactos económicos da amêijoia asiática | 9 |
| 1.4 Métodos de controlo de bivalves bioincrustantes | 11 |
| 1.5 Anticolinesterásicos | 13 |
| 1.6 Avaliação do efeito tóxico de misturas | 15 |
| 1.7 Objetivos e estratégia de trabalho | 17 |
| 2. Material e métodos | 22 |
| 2.1 Recolha e manutenção dos organismos-teste | 22 |
| 2.2 Biocidas testados..... | 22 |
| 2.3.1. Exposição a cada um dos biocidas selecionados individualmente..... | 24 |
| 2.3.2 Exposição a combinações binárias dos biocidas selecionados | 25 |
| 2.4 Ensaio de mortalidade..... | 26 |
| 2.4.1 Potencial biocida das exposições singulares..... | 27 |
| 2.4.2 Potencial biocida de misturas binárias..... | 28 |
| 3. Resultados e discussão | 30 |
| 3.1 Ensaio de mortalidade com compostos individuais | 30 |
| 3.2 Determinação da atividade de colinesterases após exposição individual aos compostos ... | 34 |
| 3.3 Determinação da atividade das colinesterases após exposição a misturas binárias dos compostos modelo..... | 39 |
| 3.3.1 Combinação sulfato de cobre/dimetoato em Dafenil®..... | 40 |
| 3.3.2 Combinação SDS/diclorvos | 42 |
| 3.4 Ensaio de mortalidade com misturas binárias dos compostos modelo | 43 |
| 3.4.1 Mistura cobre/dimetoato em Dafenil ®..... | 44 |
| 3.4.2 Mistura SDS/diclorvos | 49 |
| 4. Considerações finais..... | 54 |
| 5. Bibliografia | 57 |

1. Introdução

As espécies invasoras podem ser definidas como espécies de organismos que podem ser encontradas fora da sua distribuição nativa e que têm impactos adversos nos ecossistemas invadidos (Colautti and MacIsaac, 2004). A introdução de espécies invasoras é atualmente a segunda ameaça mais importante à manutenção da biodiversidade a nível mundial (Simard et al., 2012), sendo também responsável por perdas económicas que rondam os 5% do rendimento bruto mundial (Simard et al., 2012; Pimentel et al., 2007; Pimentel et al., 2005).

O processo de invasão é complexo e ocorre simultaneamente em múltiplos locais do globo. Pode ser descrito como uma sequência de eventos, em que inicialmente ocorre uma fase de dispersão, seguida de uma fase de estabelecimento, aclimação, e finalmente a fase de expansão da espécie invasora (Davis, 2009). A prevalência de cada uma destas fases implica o término e o sucesso da fase que a antecede (Davis, 2009). É um processo gradual e por vezes lento, existindo inclusivamente vários exemplos de espécies invasoras que se mantêm num local onde foram introduzidas com densidades baixas durante meses, anos ou mesmo décadas antes de exibirem um crescimento exponencial. É este mesmo crescimento exponencial que define a designada etapa de expansão e o momento em que se concretiza efetivamente o seu potencial invasor. O período em que se mantêm com baixas densidades é conhecido como fase de desfasamento e é caracterizado por um fraco crescimento da população (Sousa et al., 2008b).

Na base de dados DAISIE - Delivering Alien Invasive Species Inventory for Europe (DAISIE 2008) estão registadas mais de 10000 espécies exóticas em território europeu. Destas, cerca de 11% são capazes de provocar danos nos ecossistemas invadidos, e 13% provocam danos económicos nos países invadidos. Uma análise das proporções entre grupos de organismos invasores revela que os vertebrados terrestres e organismos de água doce merecem especial atenção, já que mais de 1/3 das espécies conhecidas provoca danos económicos ou ecológicos (Vila et al., 2010).

Os ecossistemas aquáticos estão especialmente vulneráveis a este problema, tendo a dispersão geográfica de espécies invasoras aumentado ao longo das últimas décadas. Este fenómeno pode ser explicado em parte pelo desenvolvimento e massificação da aquacultura, bem como pelo desenvolvimento e expansão dos transportes marítimos. Esta última via de transporte é especialmente importante já que uma parte considerável das invasões em meio aquático é atribuída à descarga accidental de água de lastro contaminada com propágulos de espécies invasoras aquáticas (Spaccesi, 2013).

Uma das espécies que se enquadra neste cenário é a amêijoia *Corbicula fluminea*, um bivalve de água doce pertencente ao filo Mollusca, classe Bivalvia (Pelecypoda), subclasse Heterodonta, ordem Veneroida e à superfamília Corbiculoidea (Corbiculacea) (Fuller and Britton, 1980). Vulgarmente conhecido como amêijoia asiática, e considerado atualmente como uma das 100 espécies invasoras mais preocupantes pelo portal DAISIE (DAISIE, 2008, 2014; Rosa et al., 2014b), este bivalve é capaz de provocar graves problemas de bioincrustação¹ em indústrias hidro-dependentes que infesta (Rosa et al., 2011; Sousa et al., 2008a; Sousa et al., 2008b).

¹ Bioincrustação é a acumulação indesejada de microrganismos, plantas, algas e/ou animais em estruturas molhadas (Ashraf et al., 2014). O termo equivalente em inglês, *biofouling*, é muitas vezes empregue em vez da tradução apresentada.

A taxonomia das espécies pertencentes ao género *Corbicula* não se encontra completamente resolvida. Algumas dúvidas subsistem, motivadas pela larga variação que se observa entre populações, de parâmetros onde se incluem a morfologia da concha, coloração e biologia reprodutiva (Sousa et al., 2008a), bem como pelas conclusões a que se chegou quando o género começou a ser alvo de estudos de tipagem genética. Neste contexto, importa clarificar que doravante neste trabalho o taxon *Corbicula cf fluminea* será referido como *Corbicula fluminea*.

A distribuição original da amêijoia asiática esteve durante muito tempo confinada à Ásia, África e Austrália (áreas de distribuição nativa). No entanto, a espécie tem-se disseminado de forma massiva ao longo do último século (Rosa et al., 2011; Sousa et al., 2008a; Sousa et al., 2008b). Subsistem também algumas dúvidas relativamente a esta questão já que existem registos fósseis na Europa e na América do Norte que evidenciam a presença da espécie nestes locais antes da última glaciação; se tivermos em conta esses registos, poderemos mesmo considerar que o reaparecimento da espécie na Europa e/ou América do Norte se trata de recolonização e não de verdadeira invasão (Sousa et al., 2008a).

Ao sucesso da invasão por esta espécie estarão associadas algumas das suas características biológicas como o crescimento rápido, elevada fecundidade e maturação sexual precoce (Ilarri et al., 2012), e a sua associação a atividades humanas (transporte accidental em água de lastro, uso como isco, uso ornamental em aquarofilia, recurso alimentar) (Ilarri et al., 2012; Sousa et al., 2008a; Sousa et al., 2008b). Esta relação com atividades humanas é evidenciada por aquela que se pensa ter sido a razão para a introdução desta espécie nos E.U.A.: uma ação deliberada por parte de emigrantes de regiões asiáticas, que utilizam esta espécie na sua dieta (Sousa et al., 2008b; Phelps, 1994).

Desde o seu primeiro avistamento na Colúmbia Britânica nos anos vinte do século passado, esta espécie tem colonizado uma grande parte do continente Americano (Mouthon, 2001), tendo sido posteriormente encontrada na América do Sul (no Brasil e Argentina) no início dos anos 60 (Reyna et al., 2013). Na Europa, foi em Portugal e França que foi reportada pela primeira vez nos anos 80; e nos anos seguintes colonizou vários países, como Holanda, Alemanha, Espanha e Bélgica (Mouthon, 2001). Esta capacidade de disseminação massiva que se verificou ao longo do último século permitiu que a espécie se encontre agora presente na América do Norte, Europa, América do Sul e África (Pérez-Quintero, 2008; Sousa et al., 2008b). Deve ainda referir-se que esta espécie é uma peste ainda em expansão (Caffrey et al., 2011; Rosa et al., 2011; Sousa et al., 2008b).

No caso de Portugal em particular, *C. fluminea* está presente desde o início dos anos 80 no estuário do Tejo, sendo que esta pode mesmo ter sido a principal porta de entrada da espécie na Europa (Mouthon, 2001). Em 1988 a espécie podia ser já encontrada no estuário do Douro (Nagel, 1989), tendo colonizado em 1989 o estuário do Minho (Araujo et al., 1993). Foi já em 2000 que a espécie colonizou os estuários do Mondego (Pérez-Quintero, 2008) e Guadiana (Chainho et al., 2006), tendo sido posteriormente reportada no estuário do Rio Lima em 2002 (Sousa et al., 2006). A seguir, Reis (2006) reportou a presença da espécie no Rio Vouga e nas Ribeiras do Oeste, enquanto Moraes et al. (2009) reportaram a presença da espécie no Rio Sado. Rosa et al. (2011) fizeram a última atualização conhecida da distribuição nacional da espécie, acrescentando à lista de bacias hidrográficas invadidas a do Rio Mira e as Ribeiras do Algarve.

Como havia já sido referido, a capacidade de dispersão e potencial invasor de *C. fluminea* estão relacionadas com as suas características biológicas. A secção seguinte apresenta as principais características biológicas da espécie, ajudando a compreender as

razões e origem dos problemas associados ao estabelecimento da mesma em áreas não nativas.

1.1 Caracterização biológica da espécie

Corbicula fluminea é atualmente uma das espécies invasoras de ecossistemas dulçaquícolas mais difundida (Franco et al., 2012; Sousa et al., 2008a; Sousa et al., 2008b). Para o seu sucesso como espécie invasora e dispersão alargada contribuíram algumas características, como uma taxa de crescimento acelerada, maturação sexual precoce, ciclo de vida curto, grande fecundidade e associação a atividades humanas (Ilarri et al., 2012; Sousa et al., 2008a) grande variabilidade genética e plasticidade fenotípica resultante de influências ambientais (Franco et al., 2012). Uma evidência dessa plasticidade fenotípica é a capacidade de regular a massa corporal durante períodos de falta de alimento, facto que sugere uma considerável capacidade de ajuste fisiológico que permite lidar com condições variáveis de *stress* (Rosa et al., 2014b).

A sua capacidade de repovoar ambientes anteriormente colonizados, após eventos de mortalidade massiva causados por condições ambientais extremas, é mais uma indicação de uma espécie adaptada a sistemas que sofrem flutuações ambientais significativas, o que é típico de espécies invasoras com muito sucesso (Franco et al., 2012).

O conjunto destas características permite que esta espécie esteja presente numa grande variedade de ecossistemas sendo, em muitos deles, dominante face às populações de bivalves nativos (Vaughn and Hakenkamp, 2001).

1.1.1 Morfologia e ciclo de vida

C. fluminea é um bivalve que atinge um tamanho máximo entre 19 e 56 mm (Rosa 2013), com uma concha de cor acastanhada na qual se destacam cristas concêntricas. A zona mais antiga da concha é o umbo, uma saliência localizada na zona ântero-dorsal de cada valva, em torno da qual se dispõem as linhas de crescimento radial (Figura 1). Possui dentes cardinais trirradiados com três protuberâncias pronunciadas, e dentes laterais densos e serrilhados, que auxiliam o encaixe das duas valvas quando a concha fecha (Reis, 2006). Os sífões são internamente circundados por um anel negro, e entre os dois sífões podemos observar duas linhas negras bastante nítidas. Os sífões são rodeados de tentáculos, usualmente com bases pigmentadas; os tentáculos que rodeiam o sífão inalante são geralmente mais longos e com pontos negros no centro (Araujo et al., 1993).

A longevidade dos indivíduos desta espécie está compreendida entre os 1,5 e os 3 anos na maior parte das populações (Mouthon, 2001), embora haja trabalhos que reportam variações entre 1 e 5 anos (Sousa et al., 2008a). A amêijoia asiática é uma espécie hermafrodita, capaz de autofertilização e de fertilização cruzada, processos que ocorrem no interior da cavidade paleal; o desenvolvimento embrionário ocorre nas brânquias (Kraemer and Galloway, 1986). É uma espécie com grande capacidade reprodutiva, sendo que as estimativas apontam para que cada indivíduo produza entre os 8000 e os 69000 juvenis por ano (Robinson and Wellborn, 1988). A maturação sexual ocorre precocemente, geralmente entre os 3 e os 6 meses de vida (Sousa et al., 2008a), sendo reprodutivamente ativos os indivíduos que ultrapassam um tamanho mínimo de 6 mm (Sousa et al., 2008a; Denhartog et al., 1992).

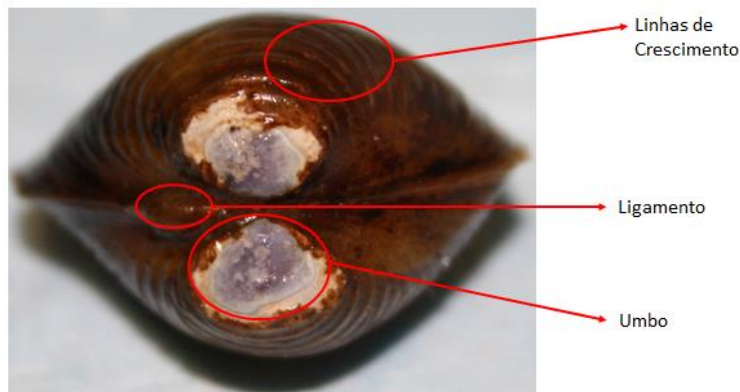


Figura 1- Aspeto exterior de *C. fluminea*. São visíveis as estrias da concha, que denotam o crescimento concêntrico da mesma, a zona do umbo com um aspeto erodido, muito típico destes bivalves, e o ligamento que une as valvas.

Têm sido geralmente reportadas duas épocas reprodutivas típicas nas populações naturais de *C. fluminea*, uma entre os meses de Maio e Julho, e uma segunda entre Setembro e Dezembro (Caffrey et al., 2011). Contudo, existem estudos que apresentam outros padrões, nomeadamente a ocorrência de apenas um período reprodutivo anual, ou a ocorrência de três épocas distintas, com diferenças a existirem no mesmo local em anos diferentes. Uma possível explicação para este facto é a existência de uma relação entre os eventos reprodutivos e a temperatura da água e/ou disponibilidade de alimento (Sousa et al., 2008a). No caso particular da população utilizada no trabalho experimental incluído nesta dissertação, Rosa et al. (2014) reportou vários eventos reprodutivos tendo os principais ocorrido em Junho, Agosto-Setembro e Novembro.

Cabe ainda assinalar que esta espécie é capaz de se reproduzir com recurso a um processo reprodutivo raro, denominado androgénese, no qual os indivíduos androgénicos parasitam os recursos maternos (ovos e nutrição durante o desenvolvimento) produzindo descendentes que não incorporam material genético maternal. Neste processo, o ovo é fecundado por um espermatozoide biflagelado típico de organismos androgénicos, contendo a totalidade dos cromossomas. O oócito fecundado expulsa então todo o material genético maternal retendo as mitocôndrias, e os embriões desenvolvem-se posteriormente nas brânquias maternas, recebendo os correspondentes benefícios nutricionais (Hedtke et al., 2008).

Os descendentes podem ser libertados em fases de desenvolvimento diferentes. A capacidade de migrar das brânquias parentais para o saco dos sífões, de onde são expelidos para o meio externo, está associada a estádios posteriores ao de pedivelígera. Uma vez que é a partir do saco dos sífões que ocorre a libertação dos juvenis, será neste estágio (ou nos que o sucedem) que os descendentes são libertados. Os estádios de desenvolvimento anteriores, trocóforas e velígeras, estão usualmente associados às brânquias. O *stress* osmótico a que ficam sujeitos quando são forçados e permanecer fora do meio interno dos progenitores evidencia que estas fases larvares não estão ainda bem adaptadas à vida livre (Kraemer and Galloway, 1986). A figura 2 sintetiza o ciclo de vida desta espécie evidenciando a associação das diferentes fases com o exterior ou com o meio interno (brânquias) do organismo.

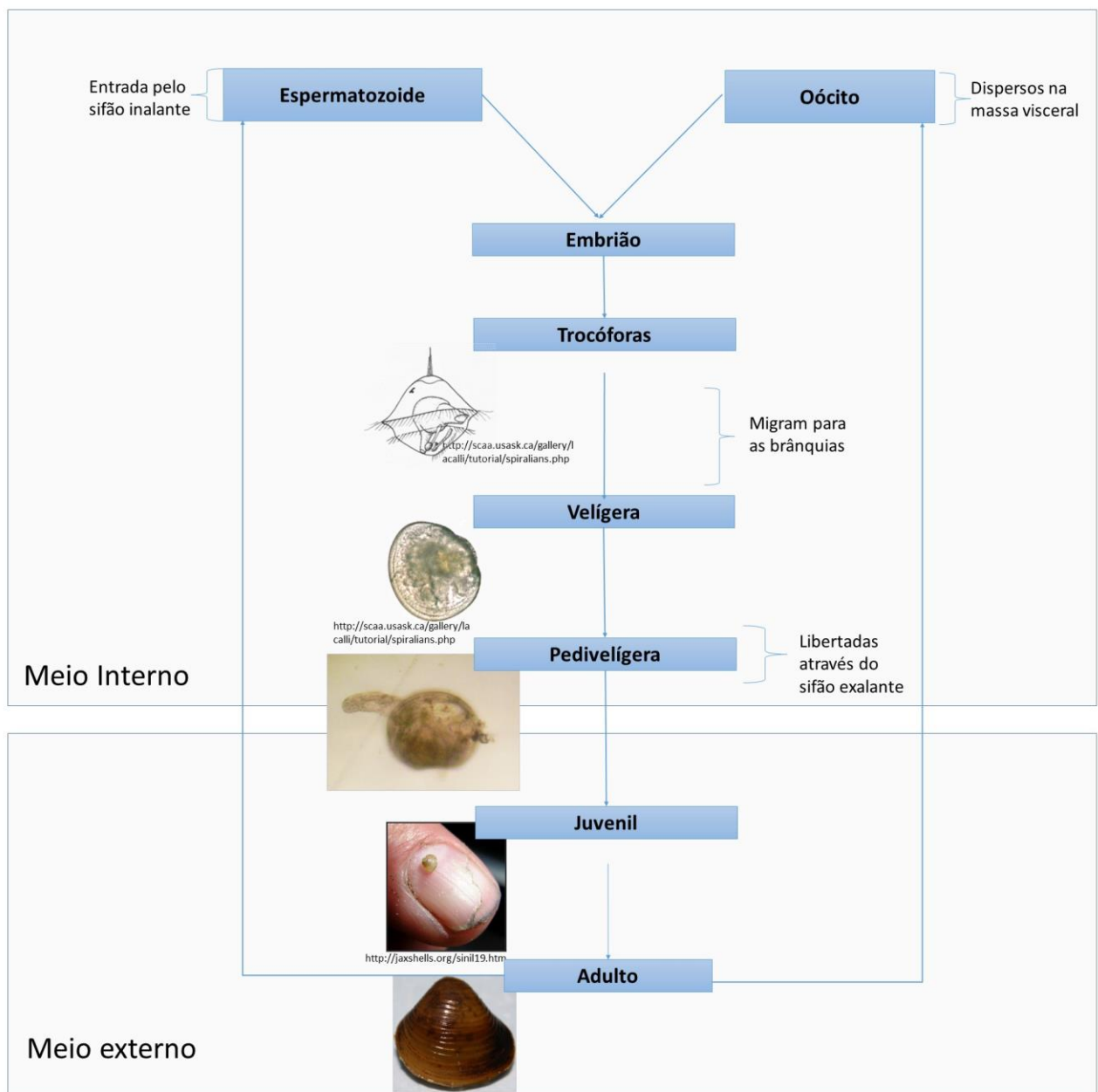


Figura 2 - Ciclo de vida de *C. fluminea*. As diferentes fases estão evidenciadas, assim como a sua associação ao meio externo ou interno do organismo. Estão também assinaladas as fases em que a prole pode ser libertada para o exterior.

As populações de *C. fluminea* têm elevada fecundidade, mas alguns fatores (baixa sobrevivência dos juvenis, mortalidade elevada ao longo do ciclo de vida, e a baixa sobrevivência dos adultos) levam ao aparecimento de populações dominadas por altas proporções de juvenis (Sousa et al., 2008a; McMahon, 2000).

Os juvenis e pré-adultos desta espécie são capazes de produzir uma linha mucosa segregada por células modificadas (mucócitos) que se encontram na face interna das demibrânquias; esta linha assiste os indivíduos na sua capacidade de flutuação, relevante para a capacidade de dispersão da espécie (Rosa et al., 2012; Prezant and Chalermwat, 1984), e poderá estar envolvida na nutrição dos embriões (Rosa et al., 2014b; Byrne et al., 2000). Contudo, segundo Rosa et al., (2014), haverá populações (nas quais se inclui aquela em que se recolheram as amêijoas usadas neste trabalho) em que os indivíduos não possuem mucócitos bem desenvolvidos, e não produzem linhas mucosas. Não tendo ainda sido encontrada uma explicação definitiva para esta observação, deve considerar-se a possibilidade de a capacidade de dispersão dos indivíduos de populações que não produzem muco estar limitada.

1.2 Impactos ecológicos da amêijoia asiática

A introdução de espécies invasoras constitui uma ameaça séria à biodiversidade por várias vias, incluindo redução da diversidade genética e erosão de fundos genéticos de populações nativas, extinção de espécies endémicas e alterações de aspetos funcionais e constituição de habitats (Vila et al., 2010). Estas alterações podem ter repercussão nas cadeias tróficas, ciclos biogeoquímicos e, por último, na economia humana (Bódis et al., 2013; Hyytiainen et al., 2013; Sousa et al., 2008a).

Várias espécies de bivalves invasores de água doce são capazes de alterar drasticamente as características ecológicas dos ecossistemas invadidos (Sousa et al., 2009; Sousa et al., 2008b), sendo inclusivamente capazes de criar, modificar e manter habitats através de alterações que operam no ambiente (Ilarri et al., 2012). Este tipo de organismos são comumente denominados também de engenheiros de ecossistemas (Werner and Rothhaupt, 2007). De entre as alterações que são capazes de operar, a produção de conchas é particularmente importante no que diz respeito à capacidade de influenciar e alterar características de um ecossistema. As conchas podem proporcionar substrato para a adesão de outras espécies, refúgio contra predadores, competidores e/ou situações de *stress* físico e fisiológico, e ainda afetar o transporte de partículas e solutos (Ilarri et al., 2014; Ilarri et al., 2012). Desta forma, e à macroescala, estas alterações podem afetar interações tróficas e afetar as taxas de processos do ecossistema como a mineralização de nutrientes, a disponibilidade de oxigénio e as taxas de sedimentação (Karatayev et al., 2005).

A amêijoia asiática é uma das espécies capazes de promover alterações que condicionam tanto a função como a estrutura dos ecossistemas, e usualmente as introduções de *C. fluminea* têm consequências para outros elementos do ecossistema, incluindo vegetação submersa, plâncton e níveis tróficos superiores (Sousa et al., 2008a). Para além da produção de conchas, outros atributos da espécie condicionam a sua capacidade enquanto engenheira dos ecossistemas. É o caso das altas taxas de filtração e da grande capacidade de remobilização do sedimento que a caracterizam. Tais processos poderão provocar uma série de mudanças nas condições ambientais, incluindo alterações do potencial redox, turbidez, quantidade de matéria orgânica e tamanho das partículas (Ilarri et al., 2012), densidades de fitoplâncton, produção primária, ciclos de nutrientes, natureza das teias tróficas, (Sousa et al., 2008a).

A referida capacidade de remobilização do sedimento relaciona-se sobretudo com a capacidade de utilização de “pedal feeding”, uma forma de alimentação de fundo em que cílios localizados no pé são usados para recolher matéria orgânica enterrada no sedimento (Vaughn and Hakenkamp, 2001), processo que poderá contribuir para a ressuspensão de

matéria particulada (Karatayev et al., 2005). A elevada acumulação de matéria orgânica libertada sob a forma de fezes e pseudofezes promovida por densas populações de amêijoas asiáticas, contribui para alterações significativas nos ciclos de matéria orgânica, adicionando matéria orgânica ao sedimento, com consequências para outras espécies bentônicas (Franco et al., 2012; Ilarri et al., 2012; Sousa et al., 2008a; Hakenkamp and Palmer, 1999). A presença da espécie pode ainda resultar num aumento da abundância das comunidades de bactérias que beneficiam do aumento da matéria orgânica disponível (Vohmann et al., 2010).

A já mencionada ocorrência de eventos de mortalidade massiva de bivalves é outra via através da qual estes bivalves podem induzir alterações no ecossistema. Tal fenómeno, embora não totalmente caracterizado, está normalmente associado a alterações de parâmetros essenciais na água e/ou a flutuações no nível da água. Estes eventos acabam por influenciar a qualidade da água, e fornecer uma grande quantidade de biomassa a ser consumida por uma miríade de organismos (Bódis et al., 2013; Sousa et al., 2013; Sousa et al., 2008a).

Outro fator relevante é a possibilidade de estes eventos de mortalidade massiva de bivalves contribuírem para o domínio de *C. fluminea* em muitas comunidades bentônicas. Estes eventos caracterizam-se por uma redução generalizada das abundâncias das espécies de bivalves afetadas, por isso a recuperação mais rápida por parte de *C. fluminea* poderá apresentar-se como uma vantagem bastante relevante, já que lhes permite explorar a quase totalidade dos recursos disponíveis após a ocorrência do dito evento, diminuindo deste modo a capacidade de recuperação das espécies nativas (Sousa et al., 2008a).

Uma revisão feita por Sousa et al. (2008a) demonstrou que vários episódios de invasão por amêijoas asiáticas provocaram impactos negativos na abundância e diversidade de bivalves nativos em ecossistemas de água doce da Europa e América do Norte. A fauna de bivalves nativos pode ser influenciada pela invasão de várias formas: redução de habitat disponível, impactos no recrutamento de espécies (ingestão de quantidades consideráveis de esperma, gloquídeos, larvas ou juvenis de espécies nativas), competição por recursos alimentares (tendo em conta que a amêijoas asiáticas tem taxas de filtração muito superiores à maioria dos bivalves de água doce), e atuando como vetor de doenças e parasitas (Sousa et al., 2008a).

No entanto, a presença de bivalves invasores, como o caso de *C. fluminea*, nem sempre é sinónimo de efeitos exclusivamente nefastos. Existem também potenciais efeitos positivos para o ecossistema, que incluem fornecimento de habitat para outras espécies, ou o facto de serem uma potencial fonte de alimento para os organismos locais (Ilarri et al., 2014; Sousa et al., 2008a), aos quais se junta a possibilidade de utilização desta espécie para depuração e/ou acumulação de poluentes (Ismail et al., 2014; Rosa et al., 2014a; Silva, 2012).

Uma fonte de preocupação adicional no que respeita aos impactos ecológicos desta peste é o potencial aumento das zonas com condições que permitem a presença de amêijoas asiáticas em cenários de aumento da temperatura global, uma vez que esta espécie é incapaz de sobreviver a temperaturas abaixo dos 2°C durante períodos relativamente longos. Assim, um aumento da temperatura global tenderá a aumentar o alcance da distribuição da espécie (Weitere et al., 2009) e dos consequentes impactos ecológicos que opera em locais invadidos. Um outro fator a ter em conta prende-se com a intervenção humana direta nos ecossistemas suscetíveis à invasão por *C. fluminea* e consequentemente aos seus impactos. Por exemplo, a nível nacional, a construção de novas barragens (11 até 2016 previstas pelo plano nacional de barragens com elevado potencial hidroelétrico) poderá contribuir para o

agravar da situação da invasão em Portugal, pois conduzirá ao aparecimento de mais massas de água com características favoráveis ao desenvolvimento de *C. fluminea* (Moraes, 2009).

Para além dos efeitos ecológicos referidos, esta espécie é capaz de causar danos significativos em indústrias dependentes da utilização de água doce retirada diretamente de cursos de água invadidos. A secção seguinte resume as principais consequências da presença da peste nessas mesmas indústrias.

1.3 Impactos económicos da amêijoia asiática

Os serviços ecológicos têm sido definidos como as condições e processos através dos quais os ecossistemas naturais, e as espécies que os constituem, sustentam e complementam a vida humana. Impactos causados nestes processos são por isso considerados impactos económicos (Davis, 2009). A avaliação ecossistémica do milénio, uma avaliação global do estado dos ecossistemas, dividiu estes serviços em 4 grupos; funções de suporte (ciclo de nutrientes, polinização, ou dispersão de sementes), serviços de regulação (retenção de solo, e regulação de perturbações), serviços de provisionamento (provisionamento de água, comida ou madeira), e serviços culturais (oportunidades para atividades recreativas ou espirituais). Perdas causadas por uma determinada espécie exótica em pelo menos uma destas funções contribuirão para a classificação dessa espécie exótica como invasora (Davis, 2009). De facto, as espécies invasoras no seu conjunto são responsáveis por perdas que rondam os 5% do rendimento bruto a nível mundial, e são ainda uma das principais razões para a perda de biodiversidade. Adicionalmente, são responsáveis por perdas de mais de 20% da produção mundial de bens alimentares (Simard et al., 2012; Pimentel et al., 2007).

Uma das espécies capazes de provocar prejuízos económicos significativos é precisamente a amêijoia asiática, o que se deve sobretudo à sua atividade bioincrustante. O carácter nefasto deste tipo de bioincrustação deriva do estabelecimento e crescimento de populações de amêijoas em estruturas e equipamentos submersos, o que irá diminuir a sua eficácia e/ou contribuir para a sua degradação (Rosa et al., 2011). Várias outras espécies de bivalves são capazes de provocar efeitos deste tipo, sendo especialmente relevantes o mexilhão zebra *Dreissena polymorpha* (Minchin et al., 2002; Bidwell et al., 1995) e *Dreissena bugensis* (Mills et al., 1996).

Estão suscetíveis a infestações por parte da amêijoia asiática empresas que estejam dependentes do uso de água doce captada à superfície a partir de massas de água naturais onde a espécie se encontre presente (Sousa et al., 2013; Rosa et al., 2011). Entre as empresas potencialmente afetadas encontram-se centrais de produção elétrica, estações de tratamento de água, fábricas de papel, centrais nucleares, cimenteiras e sistemas de irrigação agrícola (Sousa et al., 2013; Rosa et al., 2011).

As infestações geralmente ocorrem quando os juvenis e jovens adultos, de dimensões reduzidas, ultrapassam os crivos e filtros colocados nos tubos utilizados para a captação de água; posteriormente, em zonas em que a velocidade da água é menor (p.ex. tanques de água bruta), as amêijoas acumulam-se e desenvolvem-se (Mackie and Claudi, 2010). À medida que progridem no sistema, as amêijoas causam problemas normalmente relacionados com a oclusão de tubos de pequeno diâmetro (McMahon, 2002; Aldridge and McMahon, 1978; Aldridge DW, 1978), o que pode resultar no bloqueio de linhas de água essenciais, avarias nos equipamentos, diminuição da eficiência dos processos industriais, diminuição da eficiência de sistemas de segurança (como os sistemas de arrefecimento e

proteção contra incêndio), e aumento da corrosão das tubagens e equipamentos (Rosa et al., 2011). Outro efeito possível, que é particularmente relevante na indústria do tratamento de águas para consumo humano, é a contaminação da água em que se encontram quando morrem (Doherty et al., 1986).

Como foi já referido anteriormente, a amêijoia asiática está hoje associada a prejuízos económicos avultados nos Estados Unidos, com perdas associadas à presença da espécie avaliadas em 1 milhão de milhões de dólares anualmente (Wittmann et al., 2012; Pimentel et al., 2005). Contudo, os danos causados por esta peste em Portugal são ainda moderados: segundo Rosa et al. (2011) os prejuízos causados pela peste em Portugal estão avaliados na ordem dos 200 000 € anuais. No âmbito deste estudo, foi estabelecido que, de entre as empresas portuguesas suscetíveis a infestações pelo bivalve (aquelas que fazem captação de água doce em massas de água de superfície), cerca de 5% foram ou são afetadas pela presença da peste. De entre as empresas afetadas, são as empresas relacionadas com a irrigação agrícola e as centrais termoelétricas as que mais reportaram infestações (25% e 33%, respetivamente). De todos os sectores afetados, é apenas no sector da irrigação agrícola que os prejuízos verificados são já consideráveis, com perdas a rondar os 2% dos custos totais de operação (Rosa et al., 2011).

Esta disparidade de efeitos e prejuízos verificados entre Estados Unidos da América e Portugal poderá estar relacionado com diferentes estados de progressão da invasão (Rosa et al., 2011). Esta possibilidade é de resto suportada por evidências relativas a invasões de bivalves bioincrustantes, que apontam para a não existência de impactos económicos significativos até 50 anos após a colonização pela espécie (Hyytiainen et al., 2013). Nos Estados Unidos da América, decorreu um período de 20 anos entre os primeiros avistamentos da espécie no país e os primeiros casos de problemas para empresas hidrodependentes causados pela amêijoia asiática (Rosa et al., 2011). Uma outra hipótese que tem sido proposta relaciona-se com os eventos de mortalidade massiva a que a espécie é propícia durante os meses mais quentes e que acabam para contribuir para o controlo do crescimento das populações.

A fim de ilustrar a magnitude dos prejuízos que esta peste é capaz de causar, podemos utilizar o exemplo dos cálculos feitos por Hyytiainen et al. (2013), para uma hipotética central nuclear afetada por uma infestação de *C. fluminea*. O autor calculou que o custo associado à paragem da produção por eventual necessidade de remoção de amêijoas seria na ordem dos 4 000 000€ justificados pela necessidade de paragem da laboração durante 3 dias, considerando apenas o prejuízo gerado pela não produção de energia (1 200 000€/dia) e os custos da mão de obra necessária às operações de limpeza (160 000€/dia).

Actividades económicas associadas ao usufruto direto das massas de água podem também sofrer efeitos nefastos relacionados com infestações de *C. fluminea*. Exemplo disso é a infestação por plantas aquáticas, que decorre do aumento da transparência da água alicerçado na filtração de grandes volumes de água operada por populações densas do bivalve invasor. Um aumento na transparência da água, e o consequente aumento de plantas submersas, pode dificultar ou impedir a navegação, resultando em perdas económicas. O mesmo pode acontecer relativamente a um aumento da taxa de sedimentação, que poderá influenciar a periodicidade e necessidade de operações de dragagem (Sousa et al., 2013). A acumulação de conchas poderá diminuir o interesse turístico de um local invadido, ou diminuir a eficácia de redes de pesca, causando prejuízos para a economia local (Sousa et al., 2013; Ilarri et al., 2012).

Como ficou patente acima, a invasão por bivalves não nativos é um assunto de relevo que merece atenção por parte das autoridades, tanto no sentido da preservação ecológica como do benefício de atividades económicas associadas ao uso de massas de água afetadas. Assim, torna-se necessário desenvolver estratégias de gestão de espécies invasoras, tal como *C. fluminea*, que, na Europa e para esta espécie, se materializam muitas vezes na implementação de métodos de controlo de populações infestantes. A frequência e magnitude dos prejuízos verificados em algumas indústrias traduzem-se na necessidade de controlo da espécie no sentido de minimizar ou prevenir os danos causados. Para o fazer, as empresas afetadas pela peste podem socorrer-se de vários métodos que serão abordados na secção seguinte.

1.4 Métodos de controlo de bivalves bioincrustantes

Alguns organismos, entre os quais se inclui a amêijoia asiática, são capazes de causar problemas de bioincrustação em indústrias hidrodependentes. No caso da amêijoia asiática, os problemas surgem quando os juvenis da espécie são sugados para os sistemas de água da instalação industrial. Isto é possível porque os juvenis e jovens adultos desta espécie, de tamanho reduzido (< 5-10 mm), são capazes de ultrapassar os crivos de proteção que são colocados à entrada dos sistemas, desenvolvendo-se posteriormente no interior da instalação industrial. A acumulação de bivalves (ou das suas conchas vazias) irá alterar a velocidade de escoamento nas tubagens, ou inclusivamente impedir por completo a passagem da água, com consequências várias para o funcionamento do sistema (Mackie and Claudi, 2010). Alguns dos fatores que são geralmente apontados como favorecedores da bioincrustação e/ou consequente dano provocado por *C. fluminea* incluem: baixa velocidade de escoamento das tubagens, água a temperaturas amenas, presença de argila e/ou corrosão nas tubagens, sistemas de redundância/uso intermitente, fugas em válvulas, existência de componentes com diâmetro reduzido (Henager et al., 1983).

A estratégia de gestão de bivalves capazes de bioincrustação que normalmente apresenta menos custos para as empresas é a prevenção. Contudo, quando a espécie não é detetada precocemente, estando a instalação industrial já infestada por uma população de amêijoia asiática, ou quando se detetam os primeiros focos de infestação, deverá ser considerada a aplicação de estratégias de controlo. Os métodos de controlo permitem manter as densidades da população infestante em níveis suportáveis pelo processo industrial (Gabriel et al., 2013).

Entre as medidas mais adotadas no controlo da amêijoia asiática estão a remoção mecânica ou o uso contínuo de cloro como biocida. Contudo, estas medidas implicam prejuízos consideráveis. A remoção mecânica das amêijoas implica muitas vezes a paragem do processo industrial (Hyytiainen et al., 2013). O uso de cloro como agente de controlo tem-se tornado impopular junto de entidades reguladoras, sobretudo devido à produção de trihalometanos na presença de matéria orgânica, com potenciais efeitos carcinogénicos e ecotoxicológicos (Gomes et al., 2014). Não obstante estas serem as abordagens mais comuns, há outras que têm vindo a ser propostas e/ou aplicadas no controlo de bivalves infestantes, de natureza química, física, mecânica ou biológica (tabela 1). Há ainda a reconhecer o destaque que merecem as abordagens que empregam químicos de variada natureza. Os tratamentos químicos são geralmente a abordagem mais eficaz, versátil e com melhor relação custo-benefício quando se pretende controlar uma infestação (Sousa et al., 2013; Mackie and Claudi, 2010).

No contexto dos métodos químicos de controlo de bivalves infestantes há uma miríade de soluções que têm vindo a ser estudadas e propostas. A inovação neste âmbito está alicerçada no tipo de químico proposto ou na estratégia de aplicação. A estratégia de aplicação pode ser afinada em diferentes frentes, por exemplo:

(i) otimização do esquema de dosagem, tentando adequar a dosagem aos vários fatores que podem condicionar a eficácia do agente de controlo, no sentido de obter a melhor relação custo-benefício possível. Poderá optar-se por dosagens de longo termo, contínuas, por pulsos ou por aplicação única consistente com tratamento agudo. A aplicação continuada consiste normalmente na aplicação de um produto biocida por um período de tempo alargado a uma concentração geralmente mais baixa do que no caso das aplicações únicas. Pode ainda otimizar-se o esquema de dosagem no sentido de visar principalmente uma das fases do ciclo de vida, o que poderá ter vantagens já que existem fases de vida mais vulneráveis, ou que são particularmente preocupantes para uma determinada instalação em particular (Mackie and Claudi, 2010).

(ii) melhoramento do transporte do químico até ao alvo, tendo em conta as especificidades do sistema e do próprio alvo (que pode ser o organismo, neste caso os bivalves, ou um órgão específico desse organismo). Neste contexto destacam-se algumas abordagens que têm surgido na tentativa de melhorar ou criar alternativas aos métodos de controlo mais comuns de dosagem direta do químico, das quais se destacam os biocidas microencapsulados. Nesta forma, o ingrediente ativo é microencapsulado em partículas que podem ser digeridas pelos organismos a controlar. Esta abordagem permite melhorar o método de entrada do composto biocida, que é concentrado no interior do animal por ação da sua própria atividade de filtração, podendo ainda contribuir para minimizar o efeito do eventual fecho das valvas, que pode ocorrer quando o animal deteta a presença do composto. A possibilidade de ultrapassar este mecanismo de fecho das valvas contribui para uma melhoria da eficácia, e, ao mesmo tempo, a concentração proporcionada pela encapsulação sugere que haja uma diminuição dos efeitos nefastos para o ambiente já que permite a utilização de dosagens de aplicação significativamente mais baixas (Aldridge et al., 2006).

(iii) A combinação de agentes biocidas que, em mistura, evidenciem efeitos cumulativos ou sinérgicos é uma outra abordagem que permite diminuir potenciais impactos no ambiente, uma vez que permite a utilização de concentrações mais baixas dos compostos que constituem a mistura sem que se diminua, ou mesmo aumentando, o potencial biocida dos compostos usados. Este método já foi útil no controlo de várias pestes, incluindo organismos aquáticos (p.ex. *Lymnaea acuminata*, um caracol de água doce; (Singh et al., 2005)). Combinações deste tipo são muito desejáveis por razões económicas, operacionais e regulatórias (Costa et al., 2012).

Tabela 1 - Resumo dos métodos utilizados na indústria para controlo de bivalves invasores (Claudi et al., 2012a; Claudy et al., 2012b; French, 1993; Gabriel et al., 2013; Mackie and Claudy, 2010; Meehan et al., 2014).

| Tipo | Método |
|-----------------------------|--|
| Controlo químico | Químicos oxidantes <ul style="list-style-type: none"> • Cloro, dióxido de cloro, cloroaminas, brometo, peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio |
| | Químicos não oxidantes e formulações comerciais <ul style="list-style-type: none"> • Formulações microencapsuladas - Biobullets®, nitrato de amónia, iões de cobre, iões de potássio, metabissulfito de sódio, coagulantes/floculantes, agentes capazes de alterar o pH (ácido clorídrico; ácido fosfórico; Hidróxido de sódio • Tratamentos combinados (biocidas combinados, tratamentos químicos potenciados por altas temperaturas) • Limpeza química • Revestimentos antibioincrustantes (óxido de tributilestanho; cobre; cobre e níquel) |
| Controlo não químico | <ul style="list-style-type: none"> • Filtros de areia e galerias de infiltração • Filtração mecânica • Luz ultravioleta • Corrente elétrica • Acústica • Agitadores de alta velocidade • Aumento da velocidade de escoamento • Campo magnético • Choque térmico • Dessecação • Depleção de oxigénio • Remoção mecânica |
| Controlo biológico | <ul style="list-style-type: none"> • Potenciais agentes predadores <ul style="list-style-type: none"> Peixe-gato (<i>Pterodoras granulosus</i>) Barbo (<i>Barbus sp.</i>) Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>) Perca-sol (<i>Lepomis gibbosus</i>) • Biocida de base bacteriológica (Zequanox®) • Extratos ou exudados de plantas |

Entre os potenciais biocidas para o controlo desta praga encontram-se os compostos anticolinesterásicos, que exercem a sua toxicidade inibindo a atividade das colinesterases, o que pode conduzir à morte do organismo exposto.

1.5 Anticolinesterásicos

As colinesterases (ChE) pertencem a uma família de enzimas designadas esterases, que se caracterizam pela capacidade de hidrolisar ésteres carboxílicos (Nunes et al., 2005). Estas enzimas encontram-se preservadas entre as mais variadas formas de vida (Ramos et al., 2012). Esta família de enzimas pode ser dividida em dois grandes grupos: as i) acetilcolinesterases, muitas vezes chamadas de verdadeiras colinesterases, e ii) as butirilcolinesterases e propionilcolinesterases, conhecidas como pseudo-colinesterases (Ramos et al., 2012): As diferenças entre estes dois grupos relacionam-se com afinidade seletiva relativamente a diferentes substratos e inibidores específicos (Nunes et al., 2005).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma forma enzimática que está presente no sistema nervoso central e junções neuromusculares de um grande número de espécies animais. Esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, em colina e ácido acético. Este processo permite que os neurónios colinérgicos voltem ao estado de repouso, evitando uma estimulação neuromuscular excessiva (Ramos et al., 2012; Nunes, 2011). A inibição desta enzima leva à acumulação de acetilcolina, que estimula continuamente os recetores colinérgicos das membranas pós-sinápticas (Nunes, 2011; Varó et al., 2007a). A inibição da AChE promove assim a acumulação de quantidades excessivas de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares, o que resulta em sintomas típicos de toxicidade colinérgica (Beltran and Pocsidio, 2010), espasmos dos músculos voluntários seguidos de paralisia (Fulton and Key, 2001), que podem culminar na morte do organismo exposto (Nunes et al., 2005). A recuperação da atividade enzimática dos organismos que sobrevivem a exposições agudas deste tipo de compostos depende de uma desfosforilação lenta mas espontânea do centro de reação inibido e da síntese de AChE *de novo* (Lundebye et al., 1997).

A butirilcolinesterase é uma outra forma colinesterásica que pode ser encontrada na maioria dos vertebrados. Esta enzima está presente no plasma, células hematopoiéticas, fígado, pulmões, coração, sinapses colinérgicas, sistema nervoso central, em tumores e em tecidos embrionários em desenvolvimento. Pensa-se que esta enzima poderá estar envolvida na regulação da proliferação celular e nas fases primordiais do desenvolvimento neuronal (Mack and Robitzki, 2000).

A quantificação da inibição da atividade de colinesterases tem sido usada de forma rotineira para a avaliação da exposição e consequentes impactos biológicos em organismos expostos a compostos organofosforados e carbamatos (Lundebye et al., 1997). Uma vez que a inibição de colinesterases é o alvo principal dos pesticidas organofosforados (Fulton and Key, 2001), a atividade das colinesterases tem sido muito usada como biomarcador de exposição a este tipo de compostos (Beltran and Pocsidio, 2010), contudo deverá ter tida em atenção que existem outros compostos, nomeadamente detergentes, metais, surfactantes e misturas complexas de poluentes que são capazes de produzir inibição de colinesterases (Ramos et al., 2012; Nunes et al., 2005).

Os pesticidas organofosforados estão entre os mais usados a nível mundial (Fulton and Key, 2001), o que está relacionado com a sua eficácia contra as espécies alvo e a relativamente baixa persistência no ambiente, pois são geralmente degradados por contacto com o ar, luz U.V., hidrólise química, e microorganismos do solo (Beltran and Pocsidio, 2010). Contudo, uma fraca especificidade e efeitos tóxicos para espécies não-alvo constituem importantes efeitos negativos decorrentes do uso de compostos deste tipo (Fulton and Key, 2001).

A presença de organismos com baixas taxas de atividade de ChE permite, por exemplo, identificar ecossistemas afetados por poluição com compostos organofosforados (Beltran and Pocsidio, 2010). Este parâmetro encontra-se associado frequentemente a mortalidade de organismos expostos aos agentes químicos referidos. É geralmente aceite que uma inibição colinesterásica superior a 20% é indicadora de exposição a compostos organofosforados. Embora alguns organismos possam sobreviver a inibições superiores a 50%, inibições desta magnitude são normalmente associadas a uma diminuição da capacidade de sobrevivência, e inibições na ordem dos 70% resultam geralmente na morte do organismo (Varó et al., 2003).

A baixa persistência ambiental destes compostos acaba por justificar a utilização deste biomarcador, uma vez que a inibição de colinesterases é mais duradoura (por ser,

regra geral, irreversível) nos organismos afetados do que a presença ambiental destes compostos, o que permite que se identifiquem locais afetados que não seriam identificados utilizando apenas análises químicas da água (Fulton and Key, 2001).

Uma vez que um mesmo organismo pode apresentar várias formas da enzima, é necessário avaliar a sensibilidade dessas diferentes formas relativamente aos contaminantes ou tóxicos em estudo. O uso de diferentes substratos e inibidores permite a distinção entre as várias formas da enzima (Nunes et al., 2005). Esta avaliação permite identificar as formas mais abundantes ou predominantes numa dada espécie ou num determinado órgão em particular (Ramos et al., 2012) porque podem existir variações de espécie para espécie ou entre tecidos de um mesmo indivíduo (Varó et al., 2007a).

No caso da amêijoia asiática, trabalho realizado anteriormente determinou que tecidos de *C. fluminea* são ricos em colinesterases, e não numa outra esterase não específica. O mesmo trabalho determinou que a forma colinesterásica presente nesta espécie têm características que a situam entre uma acetilcolinesterase e uma pseudo-colinesterase. Os dados obtidos indicam atividade mais intensa para os substratos acetiltiocolina e propioniltiocolina, sendo por isso a capacidade hidrolítica da forma, ou formas, da enzima presente nesta espécie situada entre a das acetilcolinesterases e das pseudo-colinesterases (Ramos et al., 2012).

Neste trabalho optou-se por utilizar vários compostos, todos capazes de produzir inibição de colinesterases. Foram utilizados, como químicos modelo, o dimetoato, o cobre, dodecil sulfato de sódio (SDS) e diclorvos. Esta escolha prendeu-se com o facto destes compostos terem mecanismos de toxicidade conhecidos, que se podem relacionar com a inibição de colinesterases, embora de formas diferentes uma vez que alguns destes compostos são inibidores específicos de ChE, actuando ao nível do local activa da enzima (dimetoato e o diclorvos); os dois outros compostos (cobre e SDS) demonstram capacidade de inibir ChE mas não são inibidores específicos desta enzima (Ramos et al., 2012; Varó et al., 2007a; Varó et al., 2007b; Campagna et al., 2006; Frasco et al., 2005; Fulton and Key, 2001). Esta relação permite a utilização da atividade das colinesterases como indicador do potencial biocida do composto ou de misturas destes compostos. Atendendo à exigência logística da determinação do potencial biocida relativamente à amêijoia asiática de misturas de químicos, a utilização de um parâmetro bioquímico nestes moldes é vantajosa na análise prévia das combinações que poderão apresentar maior eficácia para fins de controlo (para mais detalhes sobre esta questão no contexto desta dissertação consultar a secção 1.7).

Uma vez que a abordagem central do presente trabalho envolve a combinação de biocidas com capacidade anticolinesterásica, torna-se relevante contextualizar os métodos de análise adotados para avaliar as respostas observadas. Assim, na secção que se segue, introduzem-se os conceitos fundamentais sobre a formulação de misturas e a previsão do seu comportamento tóxico.

1.6 Avaliação do efeito tóxico de misturas

Ao longo dos últimos anos, temos assistido a um aumento da atenção dada aos efeitos de misturas de tóxicos, e tal facto deriva da aceitação de que os organismos presentes num meio contaminado não estão sujeitos aos efeitos de um único poluente, mas antes sob a influência de misturas de poluentes; o efeito dessa mistura pode ser diferente do resultante da soma dos efeitos individuais dos seus constituintes, pelo que a análise dos efeitos de um composto quando misturado com outros é necessária, não só na toxicologia

preditiva, mas também para a caracterização de efeitos, avaliação de risco e estabelecimento de critérios ecológicos (Broderius et al., 1995).

A avaliação da toxicidade combinada de diferentes compostos tem origem na farmacologia (Berenbaum, 1989), sendo aceite a utilização dos modelos de adição de concentração (*concentration addition*; C.A) e ação independente (*independent action*; I.A.) para analisar e prever o comportamento de misturas de químicos. Também em ecotoxicologia, estes modelos e os desvios associados têm provado ser capazes de prever a toxicidade de misturas num grande número de casos (Cedergreen and Streibig, 2005).

Perante a necessidade de trabalhar com escalas quantitativas comparáveis na definição das concentrações de cada componente nas misturas, e tendo em conta que a toxicidade individual de cada componente pode ocorrer a grandezas completamente distintas, a análise dos efeitos de misturas de químicos exige que seja feita a conversão das concentrações dos elementos da mistura em unidades tóxicas (TU). A escala de unidades tóxicas é adimensional já que é conseguida através do rácio entre a concentração de interesse e o valor de EC_x (concentração a que se verifica x% de efeito) correspondente (tipicamente assumindo: mesmas unidades; mesmo composto; mesmo organismo teste; mesmo ensaio) obtido em ensaios com o elemento da mistura em causa dosado individualmente (Jonker et al., 2005). Ambos os modelos de análise do comportamento de misturas de químicos (C.A. e I.A.) são alimentados com valores de concentrações dos elementos envolvidos transformados para a escala TU, o que é essencial para evitar que sejam afetados por efeitos de escala.

O princípio assumido pelo modelo C.A. é de que os elementos da mistura agem como diluições uns dos outros e o efeito tóxico da mistura pode ser calculado somando o efeito tóxico de cada um dos componentes. É com base neste princípio que o modelo é formulado matematicamente e é por isso também que este é o modelo que mais se adequa a misturas de tóxicos com o mesmo mecanismo de toxicidade (Backhaus et al., 2000; Deneer, 2000). O cálculo do efeito da mistura é centrado na seguinte equação:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c(i)}{ECx(i)}$$

, onde n é o número de componentes da mistura, $EC\ x(i)$ é a concentração do componente i da mistura que provoca x% de efeito quando aplicado individualmente e $c(i)$ é a concentração do respetivo componente na mistura (Backhaus et al., 2000).

O modelo I.A. é baseado no princípio de que os compostos de uma mistura atuam em diferentes sistemas fisiológicos do organismo exposto (Backhaus et al., 2000). Este modelo é assim teoricamente mais adequado para a determinação dos efeitos de misturas de compostos com mecanismos de toxicidade ou locais de ação diferentes (Broderius et al., 1995), e é calculado com recurso à seguinte equação:

$$E(C\ mix) = E(c1 + \dots cN) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E\ c(i)]$$

Onde $E(Cmix)$ representa o efeito previsto (escala entre 0 e 1) de um componente n da mistura, $c(i)$ é a concentração do componente i e $E(c(i))$ é o efeito desse componente quando aplicado individualmente (Backhaus et al., 2000).

Ambos os modelos, na sua formulação base, assumem que os elementos da mistura não interagem entre si de modo a promover ou reduzir os efeitos esperados aquando de

exposições individuais de cada elemento. Exceções aos modelos base são aqueles casos em que ocorrem interações entre os componentes da mistura, que podem ser de antagonismo ou de sinergismo. No caso de ocorrer antagonismo, o efeito medido é menor do que o calculado para a aditividade simples (modelos de resposta CA e IA na sua formulação base, conforme descrito acima). No caso de os efeitos serem superiores aos previstos no caso de não interação entre tóxicos, estamos perante um efeito sinérgico (Groten et al., 2001). Este tipo de interação pode ocorrer na fase toxicocinética (processos de absorção; distribuição; metabolismo e excreção) ou na fase toxicodinâmica (efeitos químicos no recetor; alvo celular ou órgão alvo) (Groten et al., 2001). As interações sinérgicas ou antagonísticas podem ainda ser afetadas por desvios associados à gama de concentrações utilizada (*dose level*) ou ao rácio relativo dos componentes da mistura (*dose ratio*). Desvios do tipo *dose level* são caracterizados pela existência de um efeito a baixas concentrações e do oposto a concentrações altas. Já no caso dos desvios do tipo *dose ratio*, o rácio entre os tóxicos é determinante, ou seja, a interação entre os químicos é condicionada pela dominância de um dos seus componentes face ao outro na mistura (Jonker et al., 2005).

Para quantificar os desvios sinergismo/antagonismo em relação ao modelo C.A. é possível reescrever a equação de cálculo da toxicidade de uma mistura da seguinte forma:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c(i)}{f^{-1}(Y)} = \exp(G) , \text{ Onde } Y \text{ é uma função direta da resposta biológica, que}$$

pode ser calculada usando a inversa da relação dose-resposta e que assume uma escala numérica direta, ao contrário do que acontece com a equação original, em que a resposta é quantificada como uma percentagem da resposta do controlo. O grau de desvio em relação a C.A. é dado pelo valor de G.

Para quantificar desvios do tipo sinergismo ao modelo I.A., a equação de base é reescrita da seguinte forma:

$Y = u \max \phi \left[\phi^{-1} \left(\prod_{i=1}^n q_i(C_i) \right) \right] + G$, onde $q_i(C_i)$ é a probabilidade de não resposta e G é a função desvio (Jonker et al., 2005)

Para verificar se existem efeitos antagónicos ao modelo I.A. terá que ser utilizada a equação $Y = u \max \phi [\phi(P(i) \dots n - G)]$, onde P_i é a probabilidade de resposta e G é a função desvio (Jonker et al., 2005).

Neste trabalho, o enquadramento teórico acima discriminado foi aplicado à sinalização de efeitos sinérgicos de misturas dos químicos verificados na atividade das colinesterases de *Corbicula fluminea* (ver 1.5), tendo em conta os objetivos e estratégia do trabalho expostos na secção que se segue.

1.7 Objetivos e estratégia de trabalho

De acordo com o que foi apresentado no ponto anterior, no presente trabalho pretendeu-se desenvolver uma estratégia que permitisse sinalizar, de uma forma célere e eficaz, o potencial da combinação de compostos com propriedades biocidas similares enquanto estratégia de controlo para a espécie em estudo.

Para que este objetivo geral pudesse ser atingido de uma forma estruturada, foram estabelecidos uma série de outros, mais específicos, e relacionados com as diferentes fases da abordagem seguida durante o trabalho:

i) Avaliar o potencial biocida relativamente à amêijoia asiática de quatro compostos químicos com propriedades anticolinesterásicas.

ii) Avaliar a extensão da capacidade anticolinesterásica dos compostos selecionados após exposição *in vitro* de tecidos da amêijoia.

iii) Estabelecer uma eventual relação causal entre o biomarcador (atividade de ChE) e o parâmetro de toxicidade letal (mortalidade) utilizados neste estudo com cada composto.

iv) Caracterizar o comportamento tóxico relativamente à atividade colinesterásica *in vitro* de misturas dos compostos modelo, com base nos modelos C.A e I.A e determinar se existem desvios (sinergismo/antagonismo; *dose level* ou *dose ratio*) em relação a estes modelos.

v) Verificar se o comportamento tóxico das combinações estabelecidas relativamente à capacidade de inibição de ChE pode ser relacionado com o seu comportamento tóxico quando se considera a mortalidade como parâmetro de interesse.

vi) Avaliar a possibilidade de utilizar parâmetros de toxicidade alternativos, neste caso a inibição de colinesterases *in vitro*, para prever a eficácia biocida de combinações de agentes potenciais de controlo de *C. fluminea*.

vii) Discutir o potencial do uso de misturas de compostos como forma de diminuir os efeitos nefastos que possam decorrer do uso de métodos de controlo químico desta peste.

O principal inconveniente do desenvolvimento deste tipo de métodos baseados em misturas químicas no contexto do controlo de espécies com capacidade *biofouler* é a logística, e consequentemente o tempo necessário, associados aos testes de toxicidade necessários para avaliar diretamente o potencial biocida do(s) agente(s) em análise (i.e., considerando que a mortalidade é o parâmetro de interesse). Efetivamente, para que se possam avaliar de forma fidedigna as interações entre os componentes das misturas, inclusive os desvios aos comportamentos de aditividade simples, do tipo sinérgicos e/ou antagonísticos, é necessário cumprir um desenho experimental com um elevado número de tratamentos (e.g., no mínimo 19 tratamentos; vide secção 2.3.2), o que se torna inoportuno quando se visa um parâmetro como a mortalidade num organismo como *C. fluminea* – devido à variabilidade associada às respostas da espécie em ensaios de toxicidade, o desenho mínimo aceitável para um ensaio de mortalidade envolve três réplicas por tratamento com 10 indivíduos cada uma, com a monitorização da resposta todas as 24 h requerendo quase sempre manipulação de cada organismo experimental individualmente. Tendo em conta esta constatação, mas reconhecendo o potencial das combinações de agentes biocidas enquanto estratégia para o melhoramento dos métodos de

controlo, pretendeu-se aferir da possibilidade de utilizar ferramentas bioquímicas de fácil e rápida aplicação como sistema de teste alternativo para obter indicações fidedignas acerca do potencial biocida de combinações de químicos. Em particular, estava em causa a seleção de um parâmetro bioquímico que permitisse fazer uma triagem inicial das misturas com potencial, ou seja, a sinalização das combinações sinérgicas, o que permitiria acelerar o processo de desenvolvimento de soluções deste tipo aplicadas ao controlo (mortalidade) das amêijoas. O pressuposto de que houvesse uma relação direta entre a mortalidade e o parâmetro bioquímico selecionado para este efeito regrou de início a seleção dos químicos a utilizar para responder a esta questão.

De entre os biomarcadores possíveis de utilizar optou-se pela quantificação da atividade das ChEs. Este biomarcador tem como vantagens a simplicidade do protocolo a utilizar, a robustez dos resultados, rapidez e facilidade de execução, experiência prévia na sua determinação no organismo em estudo e uma ligação estreita com a mortalidade. A atividade das ChEs e os efeitos neurotóxicos resultantes da sua perturbação está diretamente relacionada com a morte do organismo (Nunes, 2011), ainda que essa possa não ser a única via através da qual o tóxico em questão possa atuar no organismo em causa (Jokanovic, 2001).

De entre os possíveis compostos a combinar optou-se pelo uso de dimetoato, combinando-o com cobre, e de diclorvos combinado com SDS. A escolha de compostos organofosforados (dimetoato e diclorvos) prendeu-se com o facto de serem pesticidas que atuam especificamente na inibição de colinesterases, e com o facto de terem uma relativamente baixa persistência ambiental, sendo por isso compostos ambientalmente menos problemáticos (Beltran and Pocsidio, 2010). O cobre e o SDS são também compostos que induzem inibição da atividade de colinesterases em diferentes organismos (Lima et al., 2013; Frasco et al., 2005; Guilhermino et al., 2000), não sendo esse, no entanto, o principal mecanismo através do qual possam exercer a sua atividade letal. Ambos afetam, entre outros alvos fisiológicos, a função branquial por diferentes vias (Sirisattha et al., 2004) e, uma vez que é comum a referência à relativamente fraca resistência desta espécie a condições de hipoxia (Sousa et al., 2008a), a utilização de um segundo elemento na combinação que atua limitando as trocas respiratórias pareceu prometedora. A seleção de ambas as combinações foi portanto regrada pela presença de um anticolinesterásico e de um segundo elemento que, tendo atividade anticolinesterásica, afetasse outras componentes da fisiologia do organismo, teoricamente maximizando o potencial tóxico da mistura face a cada composto individualmente.

A escolha dos compostos envolvidos no estudo prendeu-se ainda com a existência na literatura de muita informação relevante acerca da ação e mecanismos de toxicidade destes compostos, alguma inclusivamente gerada pela equipa de trabalho onde o presente estudo foi desenvolvido. Esta experiência anterior fornece dados importantes acerca da ação toxicológica, incluindo sobre os mecanismos de ação, destes tóxicos na espécie a controlar. O facto de se tratar de compostos muito usados foi também tido em conta aquando da escolha, uma vez que por isso a presença destes compostos numa qualquer massa de água será bastante provável (vide e.g. Varó et al. 2007a sobre a presença de diclorvos particularmente comum em locais nas imediações de explorações de aquacultura). Sabendo de antemão que o comportamento de um composto em mistura pode ser radicalmente diferente do seu comportamento quando aplicado isoladamente, é possivelmente menos danosa a libertação de pequenas quantidades de um composto já presente no meio do que a utilização de um menos comum que poderá potenciar o efeito tóxico dos outros compostos presentes no local.

Este estudo foi dividido em várias fases, conforme esquematizado na figura 3. Inicialmente foi avaliada a capacidade biocida de exposições de *C. fluminea* a cada um dos químicos individualmente (cobre, dimetoato sob a forma da preparação comercial Dafenil®, SDS e diclorvos) em ensaios de mortalidade com a duração de 96 h, no sentido de caracterizar as curvas dose-resposta (mortalidade) para cada um deles. Sabendo que os compostos utilizados são capazes de provocar inibição da atividade de colinesterases (Ramos et al., 2012; Varó et al., 2007a; Varó et al., 2007b; Campagna et al., 2006, Frasco et al., 2005; Fulton and Key, 2001), assumiu-se a existência de uma relação mais direta ou menos direta entre inibição da atividade colinesterásica e a mortalidade provocada por cada um dos compostos. Assim, com base nos resultados obtidos neste primeiro ensaio, foram estabelecidas gamas de concentrações a utilizar na fase seguinte, que consistiu no desenvolvimento de ensaios para a determinação da atividade das ChEs após exposição, *in vitro*, de homogeneizados totais de *C. fluminea* a cada um dos químicos individualmente.

Numa segunda fase foram então feitas determinações da inibição da atividade das colinesterases após exposição *in vitro* a cada um dos compostos individualmente. Os resultados obtidos foram analisados no sentido de prever a resposta (atividade colinesterásica) a tratamentos de combinação de cada par de químicos (misturas binárias). Com base nessa previsão, definiram-se tratamentos combinados para exposições *in vitro* de homogeneizados de *C. fluminea* posteriores, que permitiriam validar a previsão efetuada ou analisar os desvios a essa previsão. O efeito destes tratamentos combinados na atividade das ChE foi então testado numa terceira fase. A comparação dos resultados experimentais obtidos nesta terceira fase e os previstos de acordo com os modelos C.A e I.A. assumindo a inexistência de interações entre tóxicos, permitiu verificar a existência de desvios do tipo sinergismo/antagonismo. Assumindo que a um aumento da capacidade de inibição de ChE da mistura, relativamente a exposição equivalente a cada componente, corresponde um aumento da capacidade biocida, foram selecionadas misturas em que se verificou a existência de efeitos sinérgicos *in vitro*. A eficácia biocida destas misturas selecionadas foi avaliada numa quarta fase, em ensaios *in vivo*, usando a mortalidade (parâmetro de interesse no âmbito do desenvolvimento de métodos de controlo direcionados para o bivalve *C. fluminea*) como resposta de referência. Estes ensaios permitiram verificar se efeitos sinérgicos (no que diz respeito a inibição da atividade de ChE) se traduziriam num também sinérgico aumento da capacidade biocida das misturas, assim fornecendo indicações sobre a adequabilidade da estratégia metodológica seguida no contexto do melhoramento de métodos de controlo baseados na combinação de biocidas.

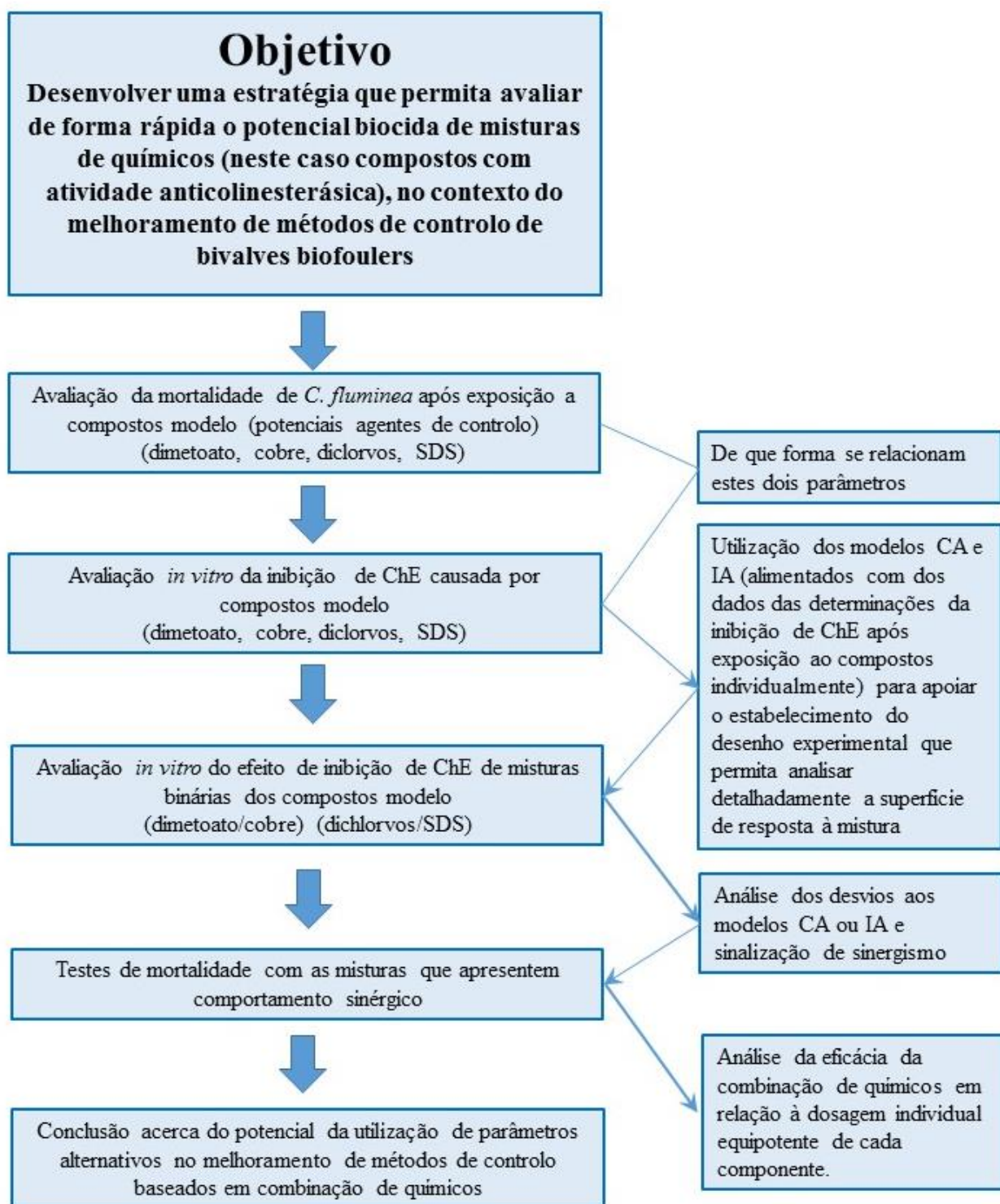


Figura 3 – Representação esquemática das etapas de trabalho, em integração com os objetivos fundamentais do mesmo e com menção a aspetos fundamentais de enquadramento teórico.

2. Material e métodos

2.1 Recolha e manutenção dos organismos-teste

Os organismos usados nos vários ensaios foram recolhidos na localidade de Casal de São Tomé, concelho de Mira, num dos canais que desagua na Ria de Aveiro (N40°25'06.09''/W8°44'13.18'') onde se encontra uma população de *C. fluminea* bem estabelecida e numerosa. Um trabalho anterior realizado na área (Rosa et al., 2014a), que quantificou os metais presentes nos tecidos de espécimes recolhidos neste mesmo local, revelou a existência de concentrações moderadas de metais, não existindo informação acerca da presença ou não de compostos de natureza orgânica, como os organofosforados.

A recolha foi feita com recurso a uma rede de mão, com a qual se fez uma série de arrastos, tendo em atenção a necessidade de se revolver o sedimento para desalojar as amêijoas que nele se encontravam enterradas. De entre os indivíduos adultos capturados foram selecionados aqueles cujas dimensões se encontravam compreendidas entre os 20 e os 30 mm. A escolha desta classe de tamanho representa um compromisso entre a abundância no local de recolha e as vantagens de utilizar indivíduos maiores nos ensaios *in vitro* (permite que sejam necessários menos indivíduos para obter a quantidade de tecido necessária para os ensaios bioquímicos). Após captura, os organismos recolhidos foram transportados para o laboratório, em baldes de 20 litros com água recolhida no local. Os restantes foram descartados após captura. Após chegada ao laboratório, as amêijoas foram mudadas para baldes de 20 L, contendo água da torneira desclorinada, e em densidades inferiores a 500 indivíduos por balde. Foram mantidas, por um período nunca superior a 2 meses, numa sala com condições controladas de temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo ($16\text{ h}^{\text{L}}:8\text{ h}^{\text{E}}$), com arejamento contínuo e mudanças de água periódicas (pelo menos duas vezes por semana) até serem utilizadas nos ensaios.

Os animais foram alimentados semanalmente *ad libitum* com uma suspensão concentrada da microalga verde *Raphidocelis subcapitata*, tendo permanecido, no mínimo, uma semana em laboratório antes da sua utilização nos ensaios para garantir a sua aclimação, permitindo ainda que ocorra depuração de contaminantes não incorporados pelos organismos.

2.2 Biocidas testados

No decorrer deste trabalho foram utilizados os seguintes compostos:

i) Dimetoato (99% w/w), fornecido pela empresa Sigma Aldrich. Este composto é um inseticida organofosforado sistémico de contacto usado para o controlo de um grande número de pragas (Beusen and Neven, 1989b), e exerce a sua toxicidade por inibição da atividade de ChE e consequente sobre-estimulação do sistema nervoso, que, se prolongada, culmina com a morte do organismo exposto (Beltran and Pocsidio, 2010; Nunes, 2011). Foram já realizados alguns trabalhos de avaliação dos efeitos deste composto para várias espécies aquáticas (Campagna et al., 2006; Frasco and Guilhermino, 2002; Song et al., 1997; Beusen and Neven, 1989) e algumas espécies de bivalves (Kumar et al., 2013; Galloway et al., 2002; Escartín and Porte, 1997); trabalhos anteriores (Gabriel, 2011) atestaram a toxicidade deste composto para a espécie em estudo. Dado que se trata de um composto anticolinesterásico, tem sido utilizado em estudos em que se pretende determinar limites de concentrações que permitam a deteção da exposição de organismos aquáticos a

pesticidas organofosforados, com recurso a determinações da atividade de ChEs, a serem depois utilizados para avaliação da contaminação ambiental por compostos deste tipo (Nunes, 2011; Fulton and Key, 2001; Pope, 1999; Lundebye et al., 1997). Para os ensaios de mortalidade, e fundamentalmente por questões económicas, ao invés de adquirir e utilizar esta forma de dimetoato, optámos por uma formulação comercial cujo princípio ativo é o dimetoato (Dafenil ®; 400 g/L dimetoato) produzida pela Bayer AG. Deve referir-se que, para além dos custos associados a este trabalho em particular, há que realisticamente assumir que os encargos associados à utilização do princípio ativo à escala das indústrias afetadas não poderiam ser suportados, pelo que o significado prático do trabalho seria, logo à partida, comprometido.

ii) Sulfato de cobre penta-hidratado, adquirido à empresa Sigma Aldrich. Este composto é usado para o controlo de algas filamentosas ou na redução da abundância de fitoplâncton (Cheng and Wang, 2001). Pode ser também usado em banhos terapêuticos em aquacultura, como tratamento de desinfeção de protozoários ectoparasitas (Varo et al., 2007b). O mecanismo de toxicidade normalmente associado ao cobre é a indução da produção de espécies reativas de oxigénio (Schlenk et al., 1998). A toxicidade deste composto para espécies aquáticas têm sido também relacionada com a capacidade de provocar alterações histológicas, ligando-se a proteínas ou causando necroses do tecido brânquial, comprometendo as trocas gasosas (Monteiro et al., 2012). Existem trabalhos já realizados para avaliar o efeito tóxico deste composto em espécies aquáticas, especialmente em peixes, já que se trata de um agente de controlo de parasitas em explorações de produção de peixe (Schlenk et al., 1998; Varó et al., 2007b), existindo também alguns trabalhos de avaliação de efeitos tóxicos em espécies de bivalves (Pipe and Coles, 1995; Satyaparameshwar et al., 2006), e em particular focando *C. fluminea* (Doherty, 1990; Harrison et al., 1984a), nos quais se verificou o potencial letal deste composto. Deve ainda referir-se que tem sido demonstrado que, embora não seja esse o mecanismo de toxicidade mais imediatamente apontado, o cobre tem a capacidade de inibir a atividade de colinesterases em organismos aquáticos (Guilhermino et al., 2000; Lima et al., 2013).

iii) Diclorvos, Pestanal ® (99,1% w/w) adquirido à empresa Sigma Aldrich. Este composto é um pesticida organofosforado comumente usado em viveiros de produção de peixe para o controlo de crustáceos ectoparasitas (Varo et al., 2007a). Este composto exerce a sua toxicidade por inibição da atividade de colinesterases (Varo et al., 2007a). A toxicidade deste composto para espécies de bivalves foi já avaliada (Corsi et al., 2007; LeBris et al., 1995). No entanto, parece não existir qualquer estudo que avalie o efeito tóxico para *C. fluminea* em particular.

iv) dodecil sulfato de sódio, SDS (98,5% w/w) adquirido também à Sigma Aldrich. Este composto é um surfactante aniónico usado como agente de limpeza e em cosméticos, sendo muito utilizado em sabonetes líquidos, sais de banho e pastas de dentes (Sirisattha et al., 2004). Exerce a sua atividade tóxica em organismos aquáticos causando danos na estrutura de membranas celulares; uma vez que são o principal meio de contacto com o tóxico no compartimento aquático, as brânquias são normalmente o órgão mais afetado (Sirisattha et al., 2004), o que justifica que a asfixia seja normalmente designada como mecanismo de toxicidade primário deste composto para organismos aquáticos (Graney and Giesy, 1988). Existem vários trabalhos em que se pretendeu avaliar a toxicidade deste

composto em meio aquático (Liwarska-Bizukojc et al., 2005; Sirisattha et al., 2004), inclusive focando especificamente *C. fluminea* (Graney and Giesy, 1988). Deve referir-se que, embora o mecanismo de toxicidade mais importante para organismos aquáticos normalmente associado ao SDS não seja a inibição de ChE, vários estudos têm associado esse efeito à exposição a este composto (Guilhermino et al., 2000; Nunes et al., 2005).

Foram preparadas soluções *stock* dos compostos a testar, exceção feita para o caso do Dafenil®. Neste último caso utilizou-se a formulação comercial não diluída para dosagem direta nos recipientes de teste.

2.3 Avaliação *in vitro* da inibição de colinesterases

2.3.1. Exposição a cada um dos biocidas selecionados individualmente

A atividade das colinesterases foi determinada pelo método de Ellman et al. (1961). Uma vez que um trabalho prévio (Ramos et al., 2012) determinou que a forma, ou formas, de colinesterases mais abundantes em *C. fluminea* têm uma maior afinidade para a hidrólise do substrato acetiltiocolina, o substrato utilizado no ensaio foi o iodeto de acetiltiocolina.

Para cada ensaio, foram utilizadas 70 amêijoas, que foram sacrificadas. Com recurso a um bisturi posicionado na junção das valvas, os animais foram abertos, sendo posteriormente retirados os tecidos moles. Estes foram então colocados em tubos de eppendorf individuais, aos quais se adicionou tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, em gelo para evitar a degradação da enzima a analisar, tendo sido o material biológico posteriormente homogeneizado, a 4°C, por intermédio de um homogeneizador rotativo (Ystral d-79282).

As amostras foram então centrifugadas a 6000 rpm durante 3 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram recolhidos e juntos, passando a constituir uma única amostra. A microtubos contendo 450 µl de amostra (*pool* de sobrenadantes após centrifugação) foram adicionados 50 µl de solução de tóxico previamente diluído em tampão fosfato, de modo a que no volume final (500 µL) pudessem ser estabelecidas as diferentes concentrações pretendidas (Tabela 2). Estas concentrações foram definidas de forma a que a curva dose-resposta resultante do ensaio fosse suficientemente abrangente para permitir uma estimativa fidedigna de parâmetros de toxicidade que exigem o ajuste de um modelo matemático de predição, tais como o IC₅₀ (concentração que promove 50% de inibição da atividade enzimática) de cada um dos compostos utilizados.

Após a adição das soluções de tóxicos, foi permitido um período de incubação de 20 minutos, à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, foi determinada a atividade das colinesterases em cada uma das amostras. A atividade das colinesterases foi determinada usando iodeto de acetiltiocolina (ASChI) como substrato. A tiocolina resultante da hidrólise da ASChI reage com o ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzóico (DTNB), e desta reação resulta um composto amarelo, o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) (Ellman, 1961). A formação deste composto amarelo foi seguida espectrofotometricamente a 412 nm.

Após a determinação da atividade colinesterásica, foi necessário proceder à determinação da concentração de proteína das amostras, de modo a expressar a atividade enzimática em função do teor proteico de cada uma das amostras (critério normalizador entre amostras). Assim, a concentração proteica das amostras foi determinada segundo o

método de Bradford (Bradford, 1976). O padrão de proteína utilizado foi γ -globulina bovina.

Tabela 2 Concentrações de cada um dos compostos utilizados nos testes *in vitro* para avaliação da inibição da atividade das colinesterases em homogeneizados totais dos tecidos moles de *C. fluminea*.

| Composto | Concentrações testadas |
|-----------------------|--|
| Cobre | 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L |
| Dimetoato em Dafenil® | 54,68; 109,4; 218,75; 437,5; 875; 1750; 3500 mg/L |
| SDS | 0,19; 0,26; 0,36; 0,51; 0,71; 1 mg/L |
| Diclorvos | 0,0164; 0,02469; 0,03703; 0,055; 0,083; 0,125; 0,1875 mg/L |

2.3.2 Exposição a combinações binárias dos biocidas selecionados

As misturas a testar foram selecionadas de acordo com os dados obtidos nos ensaios de atividade das colinesterases presentes nos tecidos da amêijoia asiática, quando expostos aos compostos químicos individualmente. Esta seleção foi efetuada, e em alguns casos ajustada mediante resultados preliminares, de modo a que a totalidade da superfície dose-resposta da mistura fosse adequadamente caracterizada. O procedimento de avaliação da atividade de ChE foi em tudo semelhante ao usado para a determinação do mesmo parâmetro para os compostos individuais. A única diferença a assinalar foi a de que, neste caso, aos 450 μ l de suspensão celular foram adicionados 50 μ l de uma solução contendo os dois componentes da mistura.

As tabelas 3 e 4 apresentam as concentrações de cada um dos compostos utilizadas nos ensaios para avaliação dos efeitos das misturas na atividade das ChEs de homogeneizados de *C. fluminea*; apenas as concentrações constantes das células a sombreado (desenho fatorial incompleto de Ray) foram testadas, por serem aquelas que são críticas para a caracterização das interações entre os compostos. O plano fatorial incompleto é uma metodologia desenvolvida para amostrar, de forma eficaz, planos fatoriais completos que envolvem um grande número de variáveis independentes, e que permitem identificar estatisticamente os principais efeitos sinérgicos quando se trata de estudos sobre comportamento de misturas de químicos (Yin and Carter, 1996).

Tabela 3 - Concentrações (em mg/L e na unidade adimensional TU) de cada um dos componentes das misturas de dimetoato e cobre testadas, bem como a correspondente atividade de colinesterases prevista aplicando o modelo CA de base (i.e. assumindo que não há interação entre os químicos que possa provocar um efeito distinto da aditividade simples).

| | | Dimetoato | | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | 0 mg/L 0 TU | 0,24 mg/L 0,40 TU | 0,42 mg/L 0,68 TU | 0,71 mg/L 1,17 TU | 1,13 mg/L 2 TU |
| Cobre | 0 mg/L 0 TU | 1,00122498 | 0,73541171 | 0,67332356 | 0,60855782 | 0,54491477 |
| | 2,83 mg/L 0,40 TU | 0,81785089 | 0,51886834 | 0,48233335 | 0,45375133 | 0,4277419 |
| | 3,38 mg/L 0,48 TU | 0,78584755 | 0,50057263 | 0,46321337 | 0,43532153 | 0,41175285 |
| | 8,28 mg/L 1,17 TU | 0,59174227 | 0,41074595 | 0,37645005 | 0,35057265 | 0,33339599 |
| | 14,15 mg/L 2 TU | 0,47763334 | 0,36271659 | 0,33712257 | 0,31576515 | 0,3008789 |
| | | | | | | |

Tabela 4 - Concentrações (em mg/L e na unidade adimensional TU) de cada um dos componentes das misturas de diclorvos e SDS testadas, bem como a correspondente atividade de colinesterases prevista aplicando o modelo CA de base (i.e. assumindo que não há interação entre os químicos que possa provocar um efeito distinto da aditividade simples).

| | | Diclorvos | | | | |
|------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | 0 mg/L 0 TU | 0,0043 mg/L 0,10 TU | 0,0082 mg/L 0,19 TU | 0,0158 mg/L 0,37 TU | 0,0302 mg/L 0,7 TU |
| SDS | 0 mg/L 0 TU | 0,98675378 | 0,72448515 | 0,66583624 | 0,60105438 | 0,53212437 |
| | 0,065 mg/L 0,10 TU | 0,986357 | 0,72419383 | 0,6655685 | 0,60081269 | 0,5319104 |
| | 0,081 mg/L 0,12 TU | 0,98592737 | 0,72387839 | 0,6652786 | 0,60055099 | 0,53167871 |
| | 0,239 mg/L 0,37 TU | 0,95530039 | 0,70139174 | 0,64461229 | 0,5818954 | 0,51516258 |
| | 0,459 mg/L 0,70 TU | 0,76028458 | 0,55820905 | 0,51302061 | 0,46310679 | 0,40999686 |
| | | | | | | |

2.4 Ensaios de mortalidade

Foram utilizados três recipientes (3 réplicas) em cada um dos ensaios contendo apenas os animais e água desclorinada para serem utilizados como controlo. Os ensaios

foram feitos com condições estáticas, e com duração de 96 h. As amêijoas foram colocadas em recipientes individuais contendo 500 ml de solução de teste (réplicas). Os recipientes foram obtidos a partir de garrafões de 5 L de água para consumo humano, previamente lavados com água desclorinada e destilada, cortados para que o recipiente final ficasse com uma capacidade aproximada de 2 L. Cada um dos tratamentos compreendeu 3 réplicas e 10 indivíduos por réplica. Todas as réplicas foram sujeitas a arejamento constante e os animais não foram alimentados durante o ensaio.

No início e no final do ensaio, foram monitorizados vários parâmetros relacionados com a qualidade da água de teste, tais como a temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade, com recurso a uma sonda multiparamétrica (WTW Multi3430).

Para além destes parâmetros, foi registada a mortalidade em intervalos de 24 h após o início da exposição. Tendo em consideração as características fisiológicas da espécie, foram usados dois critérios para verificar se o animal estaria vivo em cada momento de observação: a reação ao toque quando os sifões se encontravam no exterior da concha, tendo sido considerados vivos os organismos que recolhiam os sifões; ou, no caso da concha se encontrar encerrada, a resistência oferecida pelo organismo quando a abertura da concha é forçada entre valvas com uma agulha romba - os indivíduos que ofereciam resistência à abertura da concha e que a fechavam após a agulha ter sido retirada foram considerados vivos. Os organismos mortos foram retirados do teste a cada contagem para assim se evitar a degradação do meio.

2.4.1 Potencial biocida das exposições singulares

A partir da bibliografia consultada, foram definidas gamas de concentrações exploratórias no sentido de encontrar uma faixa de concentrações que permitisse caracterizar, de forma adequada e completa, a curva dose-resposta do organismo teste após exposição a cada um dos compostos individualmente. Uma vez definidas essas gamas de concentrações a utilizar, foram feitos os ensaios para caracterizar as respostas a cada um dos tóxicos (Tabela 5).

A toxicidade de cada um dos químicos foi avaliada com base na estimativa das concentrações capazes de provocar x% do efeito medido (mortalidade) e que constituem referências de toxicidade normalizadas e/ou relevantes no contexto do controlo de pestes: concentração letal mediana (LC₅₀), ou seja, a concentração que induz uma mortalidade de 50% no final das 96 horas de exposição dos organismos; concentração capaz de induzir 10% de mortalidade (LC₁₀), que se assume ser equivalente à concentração máxima a que não se notam efeitos adversos (NOEC – No Observed Effect Concentration) (E.C., 2003); concentração capaz de induzir 20% de mortalidade (LC₂₀), que se assume ser equivalente à concentração mínima a partir da qual se notam efeitos adversos (LOEC – Lowest Observed Effect Concentration) (EC, 2003); concentrações capazes de induzir 90 e 99% de mortalidade (LC₉₀ e LC₉₉), relevantes sob o ponto de vista do controlo de pestes. Esta concentração de referência foi obtida via análise Probit (Robertson et al., 1980).

Tabela 5 Concentrações utilizadas nos ensaios de mortalidade (estáticos; 96 h) para avaliar a capacidade biocida de cobre, dimetoato, SDS e diclorvos, em exposições individuais.

| Composto | Concentrações testadas |
|-----------------------|--|
| Cobre | 5; 7; 9,8; 13,72; 19,21 mg/L |
| Dimetoato em Dafenil® | 200; 250; 312,5 ; 390,63; 488,28 mg/L |
| SDS | 3,79; 7,59; 15,16; 30,32; 60,64; 121,28; 242,56; 485,12 mg/L |
| Diclorvos | 1,36; 1,9; 2,67; 3,74; 5,22; 7,32; 10,25; 14,35 mg/L |

2.4.2 Potencial biocida de misturas binárias

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* de inibição da atividade de colinesterases com as misturas binárias, e considerando as concentrações necessárias para induzir a morte dos organismos (ponto 2.4.1.), foram efetuados ensaios de mortalidade com misturas binárias dos pares de compostos modelo, a fim de verificar se aumentos na inibição da atividade das colinesterases se traduziriam num aumento da capacidade biocida das misturas binárias dos agentes biocidas selecionados relativamente ao efeito notado em exposições a cada composto individualmente.

Os procedimentos e material utilizado foram os descritos na secção 2.4, mas neste caso utilizando misturas constituídas por uma concentração fixa de um dos componentes, e em que se fez variar a concentração do outro componente da mistura. Esta opção derivou da constatação de que todas as misturas testadas foram sinérgicas na promoção da inibição das ChE nos homogeneizados dos bivalves, e assumindo que haverá uma relação direta entre a inibição das ChE e a mortalidade dos organismos.

As concentrações usadas nos ensaios de mortalidade com misturas binárias dos biocidas modelo podem ser consultadas nas tabelas 6 e 7. Deve notar-se que, para a combinação diclorvos/SDS, o diclorvos foi sempre incorporado na mistura numa concentração fixa. Esta opção derivou da constatação de que os efeitos sinérgicos da mistura na atividade das ChE *in vitro* se deviam fundamentalmente a este componente.

Tabela 6 Concentrações utilizadas nos ensaios de mortalidade com misturas de dimetoato (em Dafenil®) e cobre. As concentrações do tóxico que variam em cada um dos casos foram reproduzidas num teste paralelo, realizado simultaneamente, em que os animais foram expostos à ação isolada desse mesmo tóxico.

| Cobre | dimetoato (em Dafenil®) |
|---|-----------------------------------|
| 2,06; 3,09; 4,64; 6,96; 10,43; 15,65 mg/L | 223 mg/L |
| 2,06 mg/L | 185; 223; 267; 321; 385; 462 mg/L |

Tabela 7 Concentrações utilizadas nos ensaios de mortalidade com misturas de diclorvos e SDS. As concentrações do tóxico que variam em cada um dos casos foram reproduzidas num teste paralelo, realizado simultaneamente, em que os animais foram expostos à ação isolada desse mesmo tóxico.

| Diclorvos | SDS |
|------------------|-------------------------------------|
| 0,2 mg/L | 1,68; 3,79; 8,53; 19,19; 64,76 mg/L |
| 1 mg/L | 1,68; 3,79; 8,53; 19,19; 64,76 mg/L |

3. Resultados e discussão

3.1 Ensaios de mortalidade com compostos individuais

As curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de mortalidade com cada um dos compostos testados estão representadas nas figuras 4-7, agrupadas de acordo com a natureza dos químicos. A mortalidade nos controles manteve-se sempre em valores $\leq 20\%$, o que é concordante com critérios gerais de validação em testes ecotoxicológicos do mesmo tipo (OECD, 2004). A monitorização dos parâmetros gerais de qualidade da água não indicou qualquer tendência de variação. A temperatura média registada foi de $19,7^{\circ}\text{C} \pm 0,09^{\circ}\text{C}$ erro padrão, o pH médio foi de $7,93 \pm 0,02$ erro padrão, a condutividade média de $8,56 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 0,07 \mu\text{S}/\text{cm}$ erro padrão e o oxigénio dissolvido assumiu valores médios de $329 \text{ mg}/\text{L} \pm 9,33 \text{ mg}/\text{L}$ erro padrão. Foi possível capturar, em todos os casos, toda a extensão da curva concentração-resposta com dados experimentais, o que permitiu um ajuste significativo do modelo de predição usado (Probit, adequado para análise de dados de natureza binomial (Robertson et al., 1980)). Assim, foi possível estimar valores de LCx de uma forma fidedigna para referência futura, enquanto dados relevantes para as bases de dados de informação (eco)toxicológica existentes sobre cada um dos químicos em causa. A tabela 8 apresenta os valores de LCx de referência estimados neste contexto.

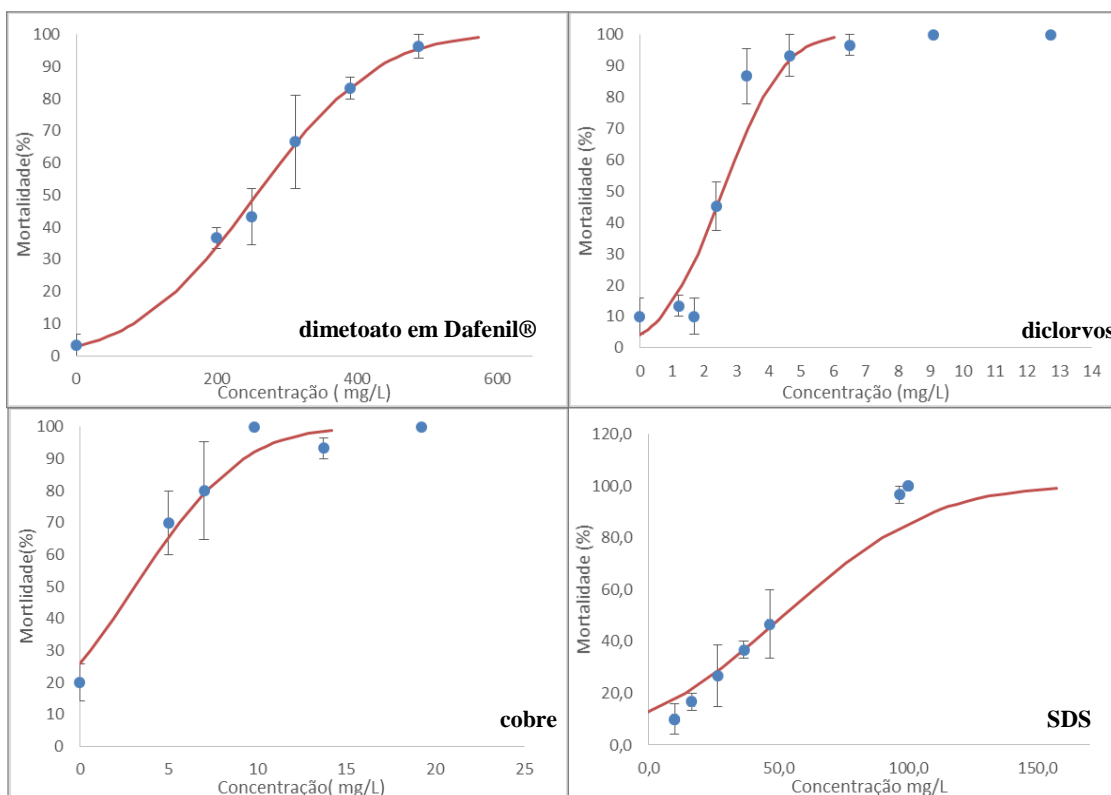


Figura 4 - Mortalidade cumulativa observada em *C. fluminea* exposta a uma gama de concentrações de dimetoato, diclorvos, cobre e SDS durante 96h; Os pontos correspondem à média de 3 réplicas (n = 10) com o respetivo erro padrão. A linha corresponde ao melhor ajuste do modelo Probit aos dados experimentais.

Tabela 8 Valores de LC_x (para x = 10, 20, 50, 90 e 99; mg/L) de referência obtidos por análise Probit da mortalidade cumulativa de cada um dos tratamentos (n=30) em cada um dos ensaios em que se expôs *C. fluminea* a dimetoato, diclorvos, cobre e SDS individualmente. Os valores apresentados entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95% obtidos para cada estimativa.

| Composto | LC ₁₀ | LC ₂₀ | LC ₅₀ | LC ₉₀ | LC ₉₉ |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Dimetoato | 81,92 (42,82 - 111,94) | 141,86 (111,83 - 165,58) | 256,55 (239,02 - 273,01) | 431,19 (406,14 - 463,16) | 573,56 (532,35 - 628,22) |
| Diclorvos | 0,67 (0,36 - 0,93) | 1,33 (1,09 - 1,53) | 2,57 (2,40 - 2,76) | 4,47 (4,18 - 4,83) | 6,02 (5,57 - 6,58) |
| Cobre | N/D | N/D | 3,10 (2,26-3,80) | 9,20 (8,31- 11,52) | 14,1 (16,50 - 24,19) |
| SDS | N/D | N/D | 52,08 (46,60 - 58,54) | 109,970 (98,70 - 124,83) | 157,162 (140,14 - 179,91) |

O valor de LC₅₀ estimado para o dimetoato (Tabela 8) é relativamente alto, comparativamente com referências equivalentes estimadas para várias outras espécies aquáticas, o que indicará uma maior tolerância relativa de *C. fluminea* a este químico. (Beusen and Neven, 1989a) reportaram um LC₅₀ de 1,7 mg/L para *Daphnia magna*, 6,8 mg/L para *Danio rerio* e 13 mg/L para *Poecilia reticulata*. O estudo descrito por Song et al., 1997 assinalou um valor de LC₅₀ de 15,73 mg/L para *Artemia sp.* e de 5,04 mg/L para *Aedes aegypti*; contudo, quando comparamos os resultados obtidos com os de Kumar et al., 2013 em testes de mortalidade com o bivalve *Lamellidens marginalis*, em que se obteve um LC₅₀ de 163,59 mg/L, os valores já se aproximam daqueles obtidos experimentalmente no presente estudo, o que indica no sentido de os bivalves em geral serem mais tolerantes ao dimetoato do que outros organismos aquáticos, incluindo vertebrados. A menor toxicidade do dimetoato para espécies de bivalves relativamente a outras espécies aquáticas poderá estar relacionada com a capacidade que estes organismos têm de detetar alguns compostos químicos na água e fechar as valvas, isolando-se do meio externo e evitando assim a exposição ao composto tóxico (Cooper and Bidwell, 2006). Por outro lado, e porque os compostos organofosforados são neurotóxicos, poderão afetar a capacidade de fechar as valvas, conforme observado por McHenery et al. (1997) para *Mytilus edulis* exposto a diclorvos; neste contexto, o tempo de exposição, sobretudo no que diz respeito ao tempo necessário para os efeitos neurotóxicos se fazerem sentir, poderá condicionar os resultados. Uma outra explicação para a aparente menor toxicidade deste composto para espécies de bivalves poderá estar relacionada com a menor quantidade de citocromo p450 que possuem comparativamente, por exemplo, com peixes e crustáceos (Dauberschmidt et al., 1997; Livingstone, 1998; Moretto and Lotti, 1998); assim, a bioativação do dimetoato em ometoato, um composto muito mais tóxico, poderá ser mais gradual, resultando numa maior tolerância do organismo exposto.

É ainda relevante reafirmar que no presente estudo foi utilizada uma formulação comercial contendo dimetoato, o Dafenil ®. É por isso importante que, quando se estabelecem comparações com valores de letalidade obtidos em outros estudos, ter em atenção que a formulação contendo dimetoato poderá conter também compostos que condicionem a sua ação biocida, o que poderá afetar os parâmetros de toxicidade obtidos.

Diferenças de tolerância podem também ser identificadas quando se comparam os dados obtidos neste trabalho com os sintetizados em Gabriel et al. (2013), que testou a capacidade biocida de dimetoato relativamente a *C. fluminea*, usando organismos recolhidos no mesmo local e registando um valor de LC₅₀ de 106,3 mg/L. Esta diferença de resultados entre o presente estudo e o de Gabriel et al. (2013) pode ser justificada pelas diferenças de sensibilidade a agentes biocidas que os bivalves podem apresentar consoante a época do ano em que ocorre a exposição (Costa et al., 2008). Por fim deve ser tido em linha de conta o facto de os animais usados no presente estudo não serem clonais, o que não permite controlar a variabilidade genética dos indivíduos usados nas experiências, necessariamente promovendo também uma variação maior na sensibilidade evidenciada na resposta a exposições a xenobióticos.

O valor de LC₅₀ obtido para o diclorvos foi de 2,57 mg/L (Tabela 8), um valor muito inferior ao obtido no caso do dimetoato. A maior toxicidade do diclorvos relativamente ao dimetoato para a espécie em estudo é um facto relevante, particularmente porque se trata de compostos que pertencem à mesma classe química dos compostos organofosforados, atuando sobre um mesmo alvo fisiológico (colinesterases). Esta discrepância poderá estar relacionada com necessidade da bioativação do dimetoato em ometoato para que este último atue de uma forma mais efetiva enquanto anticolinesterásico (Jokanovic, 2001; Roberts et al., 1999). Dado que esta reação de bioativação requer tempo, o período em que a forma mais tóxica do dimetoato na prática estará a atuar sobre o seu alvo toxicológico acabará por ser menor do que no caso do diclorvos, que não requer bioativação, e cuja ação tóxica será provavelmente imediata.

Uma comparação do LC₅₀ obtido no presente estudo com diclorvos (Tabela 8) com valores obtidos para outras espécies aquáticas não permite localizar de forma robusta a sensibilidade relativa de *C. fluminea*. As referências de toxicidade encontradas na literatura incluem dados para moluscos, que sugerem uma maior sensibilidade relativa da amêijoia asiática ao diclorvos: foram estimados valores de LC₅₀ de 31,62 mg/L para *Crassostrea virginica* por Bolton-Warberg et al., (2007); num outro trabalho de McHenery et al. (1997) obteve-se um LC₅₀ de 8,2 mg/L para *Mytilus edulis*, mas considerando uma exposição com a duração de apenas 24 horas.. No caso de dados de mortalidade para espécies de outros invertebrados e peixes, foi possível encontrar na literatura valores que variam em 4 ordens de grandeza e que denotam *C. fluminea* como uma espécie de sensibilidade intermédia ao diclorvos: para *Palaemonetes vulgaris* LC₅₀ estimado foi 0,015 mg/L; para *Crangon septemspinosa* o LC₅₀ foi 0,004 mg/L; para *Gambusia affinis* estimou-se um LC₅₀ de 5,3 mg/L; para *Pimephales promelas* estimou-se um LC₅₀ de 12 mg/L ((WHO), 1989).

Uma comparação entre as concentrações capazes de controlar de forma eficaz *C. fluminea*, na ordem dos 4,18-6,58 mg/L (limite de confiança inferior do LC₉₀ e limite de confiança superior do LC₉₉), e os LC₅₀ apresentados acima para vários organismos não alvo, permite que se preveja a extensão dos impactos ambientais que métodos de controlo com este composto podem causar. Pode verificar-se que o potencial do diclorvos para causar efeitos letais em espécies não alvo é elevado, especialmente quando consideramos as espécies mais sensíveis às quais estão associados valores de LC₅₀ várias ordens de grandeza abaixo das concentrações necessárias para um controlo eficaz de infestações de *C. fluminea*. Deve ressaltar-se que a regulamentação ambiental não permite a descarga direta de efluentes industriais e que os compostos organofosforados são em geral de degradação rápida (Beltran and Pocsidio, 2010) pelo que este tipo de avaliação tem que ser feita com alguma contenção. Não obstante, de facto não deve ser considerada apenas a maior toxicidade como critério único na escolha dos compostos a utilizar no contexto do

controle de pestes. O uso de biocidas com alvos toxicológicos muito abrangentes, como os anticolinesterásicos, que atuam diretamente inibindo ChEs, que são enzimas presentes nas mais variadas formas de vida (Ramos et al., 2012), implica uma baixa especificidade, e deve assumir-se que é provável a ocorrência de efeitos adversos em espécies não alvo paralelamente aos efeitos pretendidos nas espécies alvo. O grau do impacto em espécies não alvo poderá limitar a aplicabilidade de um composto, por isso é conveniente que a escolha de um composto biocida tenha em consideração um compromisso entre capacidade biocida e o potencial impacto causado em espécies não alvo. Esta perspectiva protetora relativamente aos ecossistemas tem estado cada vez mais presente nos trabalhos sobre o desenvolvimento de métodos de controlo de pestes (vanderWerf, 1996) estando inclusivamente patente em trabalhos efetuados no sentido específico do melhoramento de métodos de controlo dirigidos a *C. fluminea* (Costa et al., 2014; Gomes et al., 2014).

Para o cobre, o LC₅₀ obtido foi 3,10 mg/L (Tabela 8), valor que está próximo dos obtidos para outras espécies aquáticas. Wong et al., (1999) obteve um LC₅₀ de 1,24 mg/L para o peixe *Sparus sarba*, exposto por um período de 96h; Satyaparameshwar et al., (2006) determinou um LC₅₀ de 3,99 mg/L para o mexilhão de água doce *Lamellidens marginalis* e Harrison et al., (1984b) estimou que o LC₅₀ do cobre para *Corbicula manilensis* seria superior a 2,6 mg/L. Para o SDS foi obtido um LC₅₀ de 52,08 mg/L (Tabela 8) que também é da mesma ordem de grandeza dos obtidos por outros autores para outras espécies aquáticas. Assim, Liwarska-Bizukojc et al., (2005) obtiveram um valor de LC₅₀ de 27,2 mg/L para *Physa acuta*, 41,01 mg/L para *Artemia salina* e 36,58 mg/L *Raphidocelis subcapitata*. Martínez-Jerónimo and García-González, (1994) determinou um LC₅₀ de 25 mg/L para *Daphnia magna* quando exposta por um período de 48 horas.

A semelhança entre os dados recolhidos para espécies de não bivalves e os dados experimentais obtidos neste trabalho faz supor que a resposta de evitamento, que é típica de bivalves relativamente a outros compostos químicos (inclusivamente os utilizados neste trabalho), será menos relevante para o caso do cobre e do SDS, pelo menos tendo em conta a duração do ensaio - trabalhos anteriores efetuados no mesmo laboratório indicam que o cobre induz uma resposta de fecho de valvas de *C. fluminea* para evitar a exposição, mas os ensaios em causa têm uma duração de apenas 2 h. Por outro lado, a similaridade de valores de LC₅₀ sugere que a aplicação de doses passíveis de controlarem efetivamente populações de *C. fluminea* podem representar uma ameaça para os ecossistemas vizinhos - as concentrações que seriam capazes de controlar de forma efetiva *C. fluminea* variam nas gamas 8,31-24,19 mg/L (limite de confiança inferior do LC₉₀ e limite superior do LC₉₉) no caso do cobre e 98,70-179,91 mg/L no caso do SDS, comparáveis com as concentrações capazes de provocar mortalidade relevante em espécies não alvo. Assim, é provável que métodos de controlo envolvendo estes compostos possam causar efeitos indesejados em espécies não alvo. A pouca especificidade ambiental destes compostos no contexto do compartimento aquático prender-se-á com os mecanismos de toxicidade que estão normalmente associados a exposição a estes compostos, associados a sistemas fisiológicos comuns aos organismos alvo e não alvo. A toxicidade do cobre para organismos aquáticos está associada a produção de espécies reativas de oxigénio (Schlenk et al., 1998), ou à capacidade de provocar alterações histológicas ligando-se a proteínas ou causando necrose do tecido branquial, comprometendo as trocas gasosas (Monteiro et al., 2012). No caso do SDS, os efeitos tóxicos estão associados à capacidade de causar danos na estrutura de membranas celulares, sendo as brânquias, no caso de organismos aquáticos, o órgão mais afetado (Sirisattha et al., 2004); tal efeito direto geralmente culmina com a asfixia do organismo exposto (Graney and Giesy, 1988).

A aplicação de doses mais baixas durante períodos de tempo mais prolongados é uma das soluções que pode ser considerada em contextos deste tipo. No entanto, a eficácia desta alternativa dependerá do químico utilizado. Por exemplo, o trabalho de (Graney and Giesy, 1988) apresentou um valor de LC₅₀ para *C. fluminea* de 16,7 mg/L após exposição a SDS para um período de 120 horas. Tal indica que neste caso não há ganhos substanciais em termos de controlo através de exposições mais longas: a concentração capaz de induzir 50% de mortalidade é da mesma ordem de grandeza da obtida no presente estudo com uma exposição de apenas 96 h.

3.2 Determinação da atividade de colinesterases após exposição individual aos compostos

A atividade colinesterásica quantificada após exposição de homogeneizados da totalidade dos tecidos de *C. fluminea* a cada um dos compostos escolhidos é apresentada seguidamente, estando evidenciada nas figuras 8 a 12. A tabela 9 apresenta os valores resumo da análise de variância (ANOVA) a que se seguiu um teste de Dunnett (resultados apenas representados simbolicamente nas figuras) para comparação das atividades de ChE de cada um dos tratamentos com a atividade de ChE do controlo.

A exposição *in vitro* de homogeneizados totais de *C. fluminea* a concentrações crescentes dos tóxicos modelo (cobre; dimetoato; dimetoato em Dafenil®; diclorvos; SDS) resultou, em todos os casos, numa inibição também crescente e significativa da atividade das colinesterases (Figura 5; Tabela 9). Para o cobre (Figura 5-A) ocorre inibição significativa para concentrações iguais ou superiores a 3,125 mg/L tendo sido observado um nível máximo de inibição de cerca de 70% após exposição a 50 mg/L, correspondente a uma atividade média de $0,4416 \pm 0,028$ erro padrão nmol/min/mg proteína, sendo que para uma exposição a 100 mg/L de cobre foi obtida uma atividade média ligeiramente superior de $0,4934 \pm 0,028$ erro padrão nmol/min/mg proteína.

No caso do dimetoato com elevado grau de pureza (figura 5-B) foi observada inibição significativa da atividade colinesterásica (tabela 9) para concentrações iguais ou superiores a 437 mg/L, tendo sido observado um nível máximo de inibição de cerca de 60% após exposição a 3500 mg/L - neste caso foi registrada atividade de ChEs média de $0,5958 \pm 0,0140$ erro padrão nmol/min/mg proteína. A inibição significativa da atividade de ChEs pelo dimetoato quando se usa a formulação comercial Dafenil® (figura 5-C) (Tabela 9) ocorre para concentrações superiores a 218,75 mg/L, uma concentração menor do que a necessária para que ocorra inibição significativa quando é usado dimetoato com alto grau de pureza (437 mg/L). Esta tendência para uma maior eficácia da formulação comercial que se verifica para concentrações mais baixas não se mantém para as duas concentrações mais altas 1750 e 3500 mg/L, para as quais o ingrediente ativo é ligeiramente mais eficaz, com inibições de 52,78 e 61,87 %, respetivamente; concentrações equivalentes de dimetoato em Dafenil® causaram inibições de 51,83 e 56,34 %, respetivamente. Apesar destas pequenas diferenças, a eficácia na inibição de ChEs das duas formas de dimetoato utilizadas pode considerar-se equivalente, o que é vantajoso tendo em conta os objetivos do trabalho.

Para o caso do diclorvos, ocorre inibição significativa da atividade colinesterásica (tabela 9) para concentrações iguais ou superiores a 0,05 mg/L (figura 5-D), tendo sido

observada uma inibição máxima de aproximadamente 67% após exposição a 0,19 mg/L de diclorvos, concentração e para a qual se registou atividade média de ChE de $0,3675 \pm 0,013$ erro padrão nmol/min/mg proteína.

Os testes com SDS (figura 5-E) determinaram a existência de inibição de ChE significativa (tabela 9) para concentrações iguais ou superiores a 0,51 mg/L tendo sido observado um grau máximo de inibição de ChE de 88,70% após exposição a 1 mg/L de SDS, com a atividade de ChE média registada de $0,1500 \pm 0,024$ erro padrão nmol/min/mg.

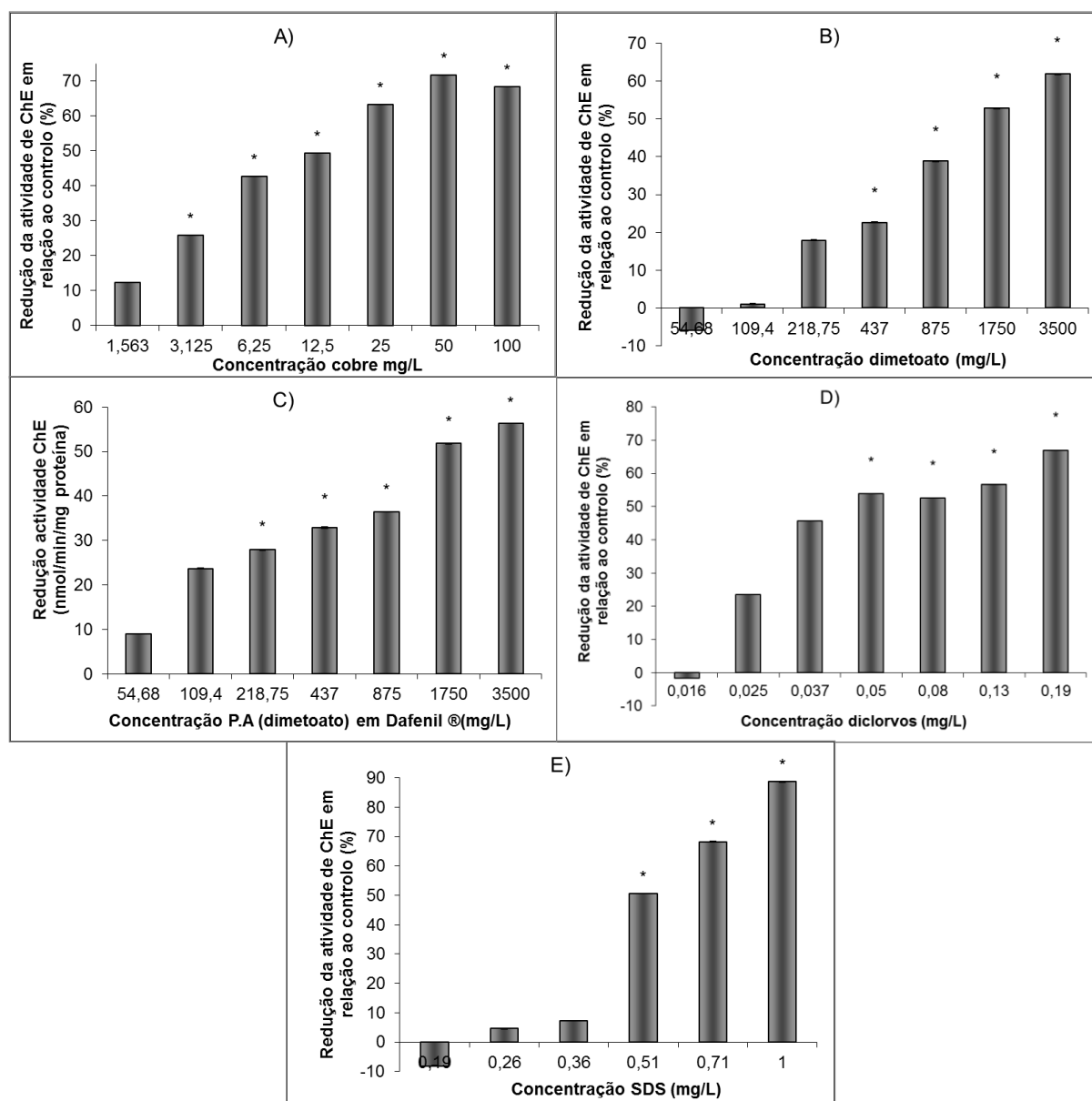


Figura 5 – Inibição (% de diminuição relativamente ao controlo) da atividade de ChEs de *C. fluminea* após exposição *in vitro* de homogeneizados totais a cobre (A); dimetoato (B); dimetoato em Dafenil® (C); diclorvos (D) e SDS (E). A redução de atividade foi calculada utilizando a média das cinco réplicas de cada tratamento comparando-a com a média de atividade do controlo. Em A, B e C, a média de atividade de ChEs do controlo foi de $1,5624$ nmol/min/mg proteína, com um erro padrão associado de $0,0450$; em D foi de $1,1084 \pm 0,0407$; em E foi de $1,3262 \pm 0,0281$. As barras de erro indicam o erro padrão correspondente. Os tratamentos em que se verificam diferenças significativas de atividade colinesterásica relativamente ao controlo (Teste de Dunnet; $p < 0,01$) encontram-se assinalados com *.

A análise dos dados obtidos no ensaio de determinação da atividade colinesterásica após exposição a cobre (figura 5-A) permitiu o cálculo de um $IC_{50}=12,47$ mg/L (8,88-16,063), um valor da mesma ordem de grandeza do obtido por Garcia et al. (2000) que obteve um IC_{50} de 27,96 mg/L para *Poecilia reticulata*. Quando se compara o IC_{50} e o LC_{50} (3,10 mg/L (2,26-3,80) mg/L; Tabela 8) obtidos no presente trabalho, é possível concluir que a mortalidade por exposição ao cobre não pode ser imputada inequivocamente à inibição de ChE, embora o composto seja de facto capaz de promover a inibição das ChEs (Frasco et al., 2005; Lima et al., 2013). A inibição direta de enzimas por metais ocorre quando o elemento substitui um cofator metálico essencial da enzima ou quando o metal interage com os seus grupos sulfidrilos (Mahar and Watzin, 2005), podendo alterar o transporte de Na e K (Louie and Meade, 1999).

O mecanismo de toxicidade do cobre para organismos aquáticos está relacionado com danos causados nas brânquias associados à indução de stress oxidativo, ligação a proteínas e necroses do tecido branquial (Letelier et al., 2005; Monteiro et al., 2012). Não sendo reconhecidamente o mecanismo de toxicidade letal fundamental em exposições a cobre, é naturalmente provável que a inibição de ChE possa contribuir para a mortalidade causada por esse mesmo composto.

É ainda importante referir que a mortalidade é um parâmetro complexo e altamente integrador, que por isso complica o estabelecimento de relações diretas com um determinado mecanismo único de toxicidade.

A avaliação da inibição da atividade colinesterásica para o caso do dimetoato seguiu uma abordagem ligeiramente diferente. Uma vez que o preço do reagente puro é um facto importante, foi necessário considerar alternativamente a utilização de Dafenil® (formulação comercial do dimetoato) nos testes de mortalidade. Assim, foi necessário aferir se existiam diferenças consideráveis entre a capacidade inibitória do princípio ativo dimetoato e a sua formulação comercial Dafenil® relativamente à atividade colinesterásica em homogenizados de tecidos moles das amêijoas.

A análise dos dados obtidos permitiu verificar que as diferenças entre ambas as formulações de dimetoato são ligeiras (figuras 5-B e 5-C). A forma pura é ligeiramente mais eficaz enquanto inibidor de ChEs para as concentrações mais altas testadas, uma tendência que se inverte para as restantes concentrações. Uma vez que é um dos objetivos deste trabalho contribuir para o desenvolvimento de métodos de controlo menos danosos para o ambiente, à questão económica já referida anteriormente, acresce a maior eficiência da formulação comercial a concentrações mais baixas, que permitem o uso de concentrações menores de dimetoato em mistura quando se usa o Dafenil®, em detrimento do composto puro. Os dados obtidos no ensaio de determinação da atividade de ChE após exposição a dimetoato dosado sob a forma de Dafenil® (figura 5-C) permitiram que se calculasse um IC_{50} de 1581,162 mg/L (1181,289-1981,034), valor comparável ao determinado no trabalho de Rios et al. (2005), em que se obteve um valor de IC_{50} de 2131 mg/L para a atividade de ChEs de eritrócitos humanos expostos a dimetoato.

A comparação do IC_{50} referido com o LC_{50} obtido para o mesmo composto no presente trabalho (256,55 mg/L (239,02 - 273,01)) revela diferenças que podem estar relacionadas com o facto de o dimetoato requerer ser bioativado em ometoato de modo a exercer a sua atividade tóxica. A bioativação ocorre devido a uma reação de dessulfurização, por ação do citocromo P450 e de monoxigenases contendo flavinas, na presença de oxigénio molecular e NADPH; desta reação resulta ometoato, um inibidor de colinesterases cerca de 1000 vezes mais potente do que o dimetoato (Syberg et al., 2008).

Este aumento da capacidade em inibir as colinesterases ocorre quando o átomo de enxofre, com fraca capacidade de captar elétrons, é substituído por um átomo de oxigénio (Jokanovic, 2001; Roberts et al., 1999). Este processo pode ser uma explicação para a necessidade de utilizar concentrações cerca de seis vezes superiores para que ocorra inibição de 50% de redução da atividade de ChEs do que aquelas necessárias para matar 50% dos indivíduos expostos *in vivo*. Já foi determinado *in vitro* algum potencial inibitório do dimetoato, mesmo sem ocorrer bioativação prévia (Buratti and Testai, 2007), não sendo por isso de excluir que possa ocorrer espontaneamente a formação de ometoato no meio reacional do teste *in vitro*, que por sua vez seja posteriormente responsável pela inibição, se bem que limitada, da atividade colinesterásica. Não obstante, é importante referir que o tempo disponível para que esta reação ocorra é diferente nos dois testes (20 min *in vitro*; 96 h *in vivo*). Por isso é possível que a proporção de dimetoato biotransformado em ometoto seja diferente nos dois testes, o que poderá ter repercussões nos resultados obtidos e seria uma explicação para as diferenças observadas.

Uma outra evidência da importância do processo de bioativação na toxicidade do dimetoato é gerada pela comparação da sua capacidade de inibição de ChEs com a demonstrada pelo diclorvos. Apesar de pertencerem à mesma classe de compostos anticolinesterásicos (agentes organofosforados), estes compostos têm uma capacidade de inibição de ChEs radicalmente diferente. A comparação entre o IC₅₀ obtido para o dimetoato em Dafenil® (1581,16 mg/L) e o obtido para o diclorvos (0,05353 mg/L) permite que se verifique que o diclorvos é muito mais eficaz enquanto inibidor de ChEs. Uma comparação entre os LC₅₀ obtidos para os mesmos compostos (tabela 8) indica que o diclorvos é cerca de 100 vezes mais tóxico que o dimetoato, e, embora seja de novo o diclorvos substancialmente mais tóxico, a diferença é menor do que na capacidade de inibição de ChEs. Tendo em conta que no caso desta classe de compostos a possibilidade de estabelecer uma relação entre o mecanismo de toxicidade (inibição de ChEs) e a mortalidade é geralmente aceite (Nunes, 2011), seria espectável que a relação entre a mortalidade e a inibição de ChE fosse similar para os dois compostos caso o dimetoato não necessitasse de bioativação. Tal não se verifica, o que reforça a relevância do tempo disponível para que ocorra bioativação espontânea do dimetoato na relação entre os dois parâmetros de toxicidade.

Quando comparamos o IC₅₀ obtido nos ensaios *in vitro* (0,05353 (0,02550-0,08157) mg/L) com o LC₅₀ de 2,57 mg/L obtido no teste de mortalidade após exposição a diclorvos, parece ser possível estabelecer uma relação entre inibição de ChEs e a mortalidade neste caso em particular. Para o estabelecimento desta relação deve ser tido em conta que a diferença de duas ordens de grandeza entre as concentrações testadas *in vitro* e *in vivo* poderá dever-se a fenómenos disposicionais, incluindo o fecho das valvas (Cooper and Bidwell, 2006; Jokanovic, 2001), e de destoxificação, em que se inclui a ação hidrolítica de enzimas OPA (*organophosphate acid anhydases*) cuja presença se encontra documentada para algumas espécies de bivalves (Noellgen and Landis, 1992), que contrariam o contacto direto do tóxico com a enzima para as condições *in vivo* (Anderson et al., 1988).

Apesar do grau de inibição de colinesterases a que uma determinada espécie consegue sobreviver ser muito variável, e de algumas espécies serem capazes de sobreviver a inibições de mais de 50% da atividade de ChE, é geralmente aceite que inibições desta ordem representam uma ameaça à capacidade de sobrevivência do organismo exposto (Ludke et al., 1975). Contudo, existem casos em que não ocorre mortalidade para inibições de ChEs superiores, e exemplo disso são os trabalhos de (Varo et al., 2002), em que se registaram inibições de 80-90% da atividade de ChEs em *Artemia*

salina e *Artemia partenogenica* após exposição a diclorvos ou clorpirifos sem que tenha ocorrido mortalidade. Outro trabalho do mesmo autor (Varo et al., 2003) refere que foram obtidas taxas de inibição de 76% e 61% em ChEs presentes no cérebro e músculo, respetivamente, de alevins de *Dicentrarchus labrax*, também sem que tenha ocorrido mortalidade dos organismos expostos a diclorvos. Em outros trabalhos acontece o oposto, com efeitos letais para inibições inferiores a 50%. É exemplo disso o trabalho de (Bocquene and Galgani, 1991), em que inibições inferiores a 40% causaram mortalidade em *Palaemon serratus* após exposição a carbaril ou fosadona; um outro exemplo é o trabalho de (Escartin and Porte, 1996), em que inibições de ChEs compreendidas entre os 39% e os 42% foram relacionadas com a morte de *Procambarus clarkii* exposto ao organofosforado fenitrotião.

Deve finalmente referir-se que o IC₅₀ obtido no presente trabalho para a atividade de ChE expostas *in vitro* a diclorvos está de acordo com os dados disponíveis na literatura para o mesmo parâmetro: Lotti and Johnson (1978) registaram um IC₅₀ de 0,020 mg/L em tecido cerebral humano exposto a diclorvos.

Também no caso do SDS o IC₅₀ (0,566 (0,523-0,609) mg/L) estimado no presente trabalho é concordante com os dados da literatura para exposição dos tecidos cerebrais de *Gambusia holbrooki* a SDS (Nunes et al. 2005). A comparação do IC₅₀ com o LC₅₀ (52,08 (46,60 - 58,54) mg/L) determinados no presente estudo para o SDS, permite que se indique como pouco provável que este composto cause mortalidade por inibição de ChEs. A toxicidade deste composto para organismos aquáticos é normalmente atribuída a danos na estrutura de membranas celulares, que no caso de organismos aquáticos se farão sobretudo sentir ao nível das brânquias (Sirisattha et al., 2004); tal justifica que a asfixia seja normalmente designada como mecanismo de toxicidade primário deste composto para organismos aquáticos (Graney and Giesy, 1988).

Um trabalho de Nunes et al., (2005), em que homogeneizados de cabeça de *Gambusia holbrooki* foram expostos a concentrações crescentes de SDS (0,0065; 0,0125; 0,025; 0,050 e 0,10 mg/L), verificou a ocorrência de inibição significativa de ChEs em ensaios *in vitro*. Contudo, o mesmo não aconteceu quando se determinou a atividade de ChEs de organismos que foram expostos ao tóxico *in vivo*. Os autores apresentam como explicação para estas destas diferenças a possibilidade de o SDS exercer efeitos tóxicos sobre as colinesterases apenas quando há contacto direto com a enzima, o que é facilitado em ensaios *in vitro* e impossibilitado por mecanismos disposicionais *in vivo*. Por outro lado, um outro trabalho Guilhermino et al., (2000), em que se expôs *Daphnia magna* a SDS, ocorreu inibição de ChEs após exposição *in vivo*, o que sugere que a ocorrência ou não de inibição de ChEs *in vivo* poderá depender da espécie ou das condições em que os ensaios são conduzidos. Por esse motivo, sem que se tenha feito uma determinação da atividade de ChEs após exposição *in vivo* de *C. fluminea* em particular, não é possível estabelecer uma relação causal fidedigna entre a inibição de ChEs e a mortalidade causada pela exposição a SDS no caso do presente estudo. Por outro lado, a diferença entre as concentrações de SDS que inibem ChEs e as que causam mortalidade em *C. fluminea* verificada neste trabalho é uma forte evidência de que este composto provavelmente não é letal por inibição de colinesterases. Apesar disso, e porque este composto é capaz de inibir ChEs, é importante considerar o SDS na avaliação da utilidade do uso deste biomarcador para o melhoramento de métodos de controlo via combinação de químicos com capacidade de inibição colinesterásica. Considerando o SDS no desenho experimental, é possível analisar se a adequabilidade do biomarcador enzimático é a mesma quando se usam

compostos cuja letalidade pode ser atribuída à inibição de ChEs ou quando essa relação não é evidente.

Tabela 9 Sumário da análise de variância (ANOVA) unifatorial aplicada à atividade das colinesterases após exposição *in vitro* de homogeneizados dos tecidos moles a cada composto testado.

| Composto | df | MS erro | F | p |
|-------------------------------|-----------|----------------|----------|----------|
| Cobre | 31 | 0,01508 | 57,21 | <0,01 |
| Dimetoato | 32 | 0,02220 | 35,49 | <0,01 |
| Dimetoato em Dafenil ® | 32 | 0,02394 | 18,97 | <0,01 |
| SDS | 27 | 0,0115 | 108,79 | <0,01 |
| Diclorvos | 32 | 0,03403 | 12,71 | <0,01 |

3.3 Determinação da atividade das colinesterases após exposição a misturas binárias dos compostos modelo

Com recurso ao ajuste calculado com base num modelo matemático (Toxcalc module; Prof. Doutor António J. A. Nogueira, 2014) dos modelos originais C.A. e I.A aos dados experimentais obtidos nos ensaios de determinação da atividade das ChEs para cada um dos tóxicos individualmente, foram sugeridas concentrações de modo a caracterizar de forma adequada o efeito combinado de misturas binárias dos tóxicos. As misturas utilizadas nestes testes são as apresentadas nas tabelas 3 e 4 e os resultados obtidos com estas exposições estão representados nas figuras 8 e 9.

3.3.1 Combinação sulfato de cobre/dimetoato em Dafenil®

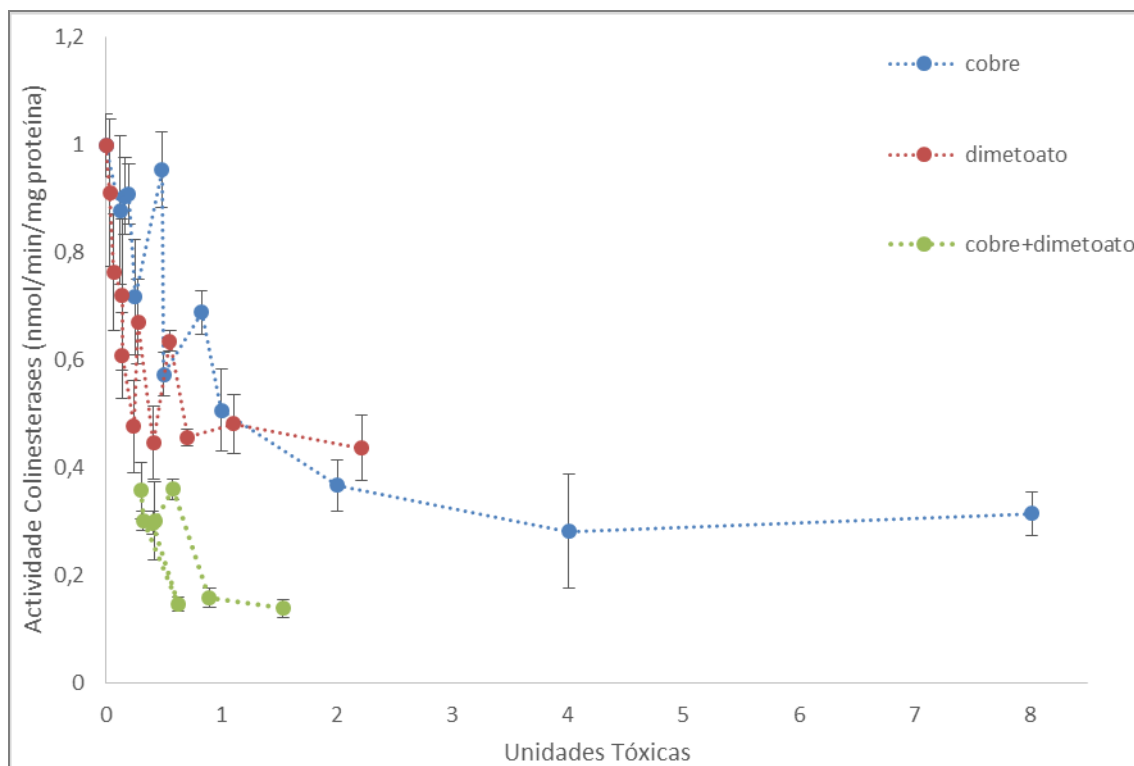


Figura 6 - Atividade média das ChEs de homogeneizados de *C. fluminea* expostos a cada um dos componentes da mistura (cobre e dimetoato) individualmente ($n = 5$), e a misturas binárias dos mesmos ($n=3$) definidos com o apoio dos modelos C.A. e I.A. (ver secção 2.3.2 e tabela 3). As barras de erro evidenciam o desvio padrão. As linhas tracejadas unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo.

A análise dos dados obtidos permitiu verificar que a capacidade inibitória do cobre foi semelhante à do dimetoato. Dado que o cobre não é um inibidor específico de ChEs, seria espectável que o dimetoato (pesticida cujo modo de ação tóxica é a inibição de ChEs) fosse melhor inibidor. Este comportamento pode ser justificado pela fraca capacidade inibitória do dimetoato antes de bioativado em ometoato (Roberts et al., 1999).

No que respeita aos valores de inibição de ChEs obtidos para a mistura (figura 6) salienta-se que a atividade de ChEs dos homogeneizados expostos à mistura é sempre menor do que atividade colinesterásica resultante da exposição aos seus constituintes de forma isolada para unidades tóxicas equivalentes, o que aponta no sentido de um maior poder de inibição da mistura relativamente aos compostos que a constituem. Por isso, e tendo em conta a formulação de base dos modelos C.A e I.A estaremos perante uma situação em que ocorre interação entre os componentes da mistura, produzindo um efeito mais do que aditivo. O ajuste do modelo I.A. modificado, de forma a refletir cada tipo de desvio possível do comportamento da mistura relativamente à formulação básica que traduz a não interatividade entre os componentes da mistura (ver secção 2.3.2), permitiu

identificar a ocorrência de sinergismo significativo em toda a superfície de resposta da mistura. O desvio do tipo sinergismo/antagonismo foi o que revelou ajustar melhor aos dados experimentais ($F = 1,423$; $P = 0,246$), conforme evidenciado na figura 7. A figura 8 representa a superfície de resposta construída com base no modelo com melhor ajuste aos dados experimentais (neste caso I.A. com desvio sinergismo/antagonismo). A forma côncava da superfície de resposta é típica de uma superfície de resposta para compostos com interações do tipo sinergismo/antagonismo, comparativamente com uma superfície completamente plana que traduziria a não interação entre os componentes da mistura (Jonker et al., 2005).

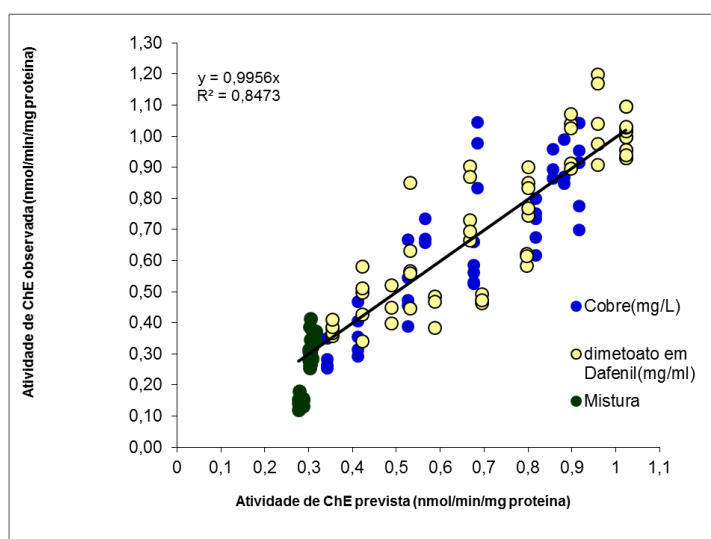


Figura 7 – Ajuste dos dados experimentais de inibição de atividade das ChEs, após exposição a misturas de dimetoato (Dafenil®) e cobre, ao modelo I.A. modificado para considerar desvios do tipo sinergismo/antagonismo. Os pontos relacionam o efeito observado experimentalmente com o efeito previsto pelo modelo modificado em causa e a linha representa a regressão linear estabelecida entre as duas variáveis. O R^2 é o coeficiente de determinação e constitui uma medida do quão fidedigna é a predição do comportamento da mistura pelo modelo em causa.

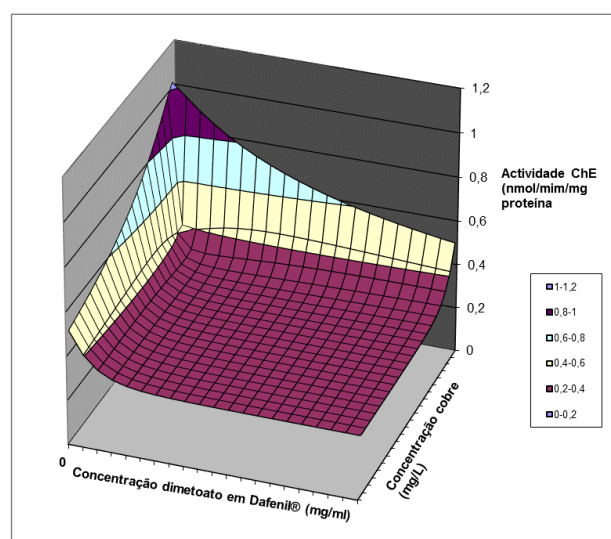


Figura 8 – Superfície de resposta construída com base no ajuste do modelo I.A., modificado para contemplar desvios do tipo sinergismo/ antagonismo, aos dados experimentais de inibição da atividade das ChEs após exposição *in vitro* de homogeneizados totais de *C. fluminea* a misturas binárias de dimetoato (Dafenil ®) e Cobre.

A análise dos resultados obtidos após exposição de homogeneizados totais de *C. fluminea* a misturas de cobre/dimetoato evidenciam a existência de efeito sinérgico entre os componentes da mistura. Embora a existência de efeitos sinérgicos no geral seja relativamente incomum (Cedergreen and Streibig, 2005; Forget et al., 1999), esse tipo de efeitos é relativamente comum para misturas contendo organofosforados que atuam no sistema colinesterásico, o que está muitas vezes relacionado com alterações nos sistemas de destoxificação - (Barata et al., 2006) argumenta neste sentido, embora não clarifique os mecanismos envolvidos. Os mecanismos que levam ao aparecimento de efeitos sinérgicos relativamente à atividade de uma enzima não são completamente compreendidos, mas podem estar relacionados com um aumento da ativação de inibidores pelo citocromo P450, inibição dos mecanismos de destoxificação ou interação entre esses dois processos (Forget et al., 1999). Apesar de ainda não estar completamente esclarecida esta tendência para um comportamento sinérgico, os dados obtidos no presente trabalho são concordantes

com outras evidências experimentais reportadas na literatura. O comportamento sinérgico entre os dois componentes testados é semelhante ao verificado para misturas entre organofosforados e metais por (Forget et al., 1999), que analisou o efeito de uma combinação diclorvos/cobre na atividade de ChEs de *Tigriopus brevicornis*, ou por (Lehtonen and Leinio, 2003), que reportou a existência de efeito sinérgico na inibição de ChEs de *Mytilus edulis* induzida por misturas de malatião e cobre.

3.3.2 Combinação SDS/diclorvos

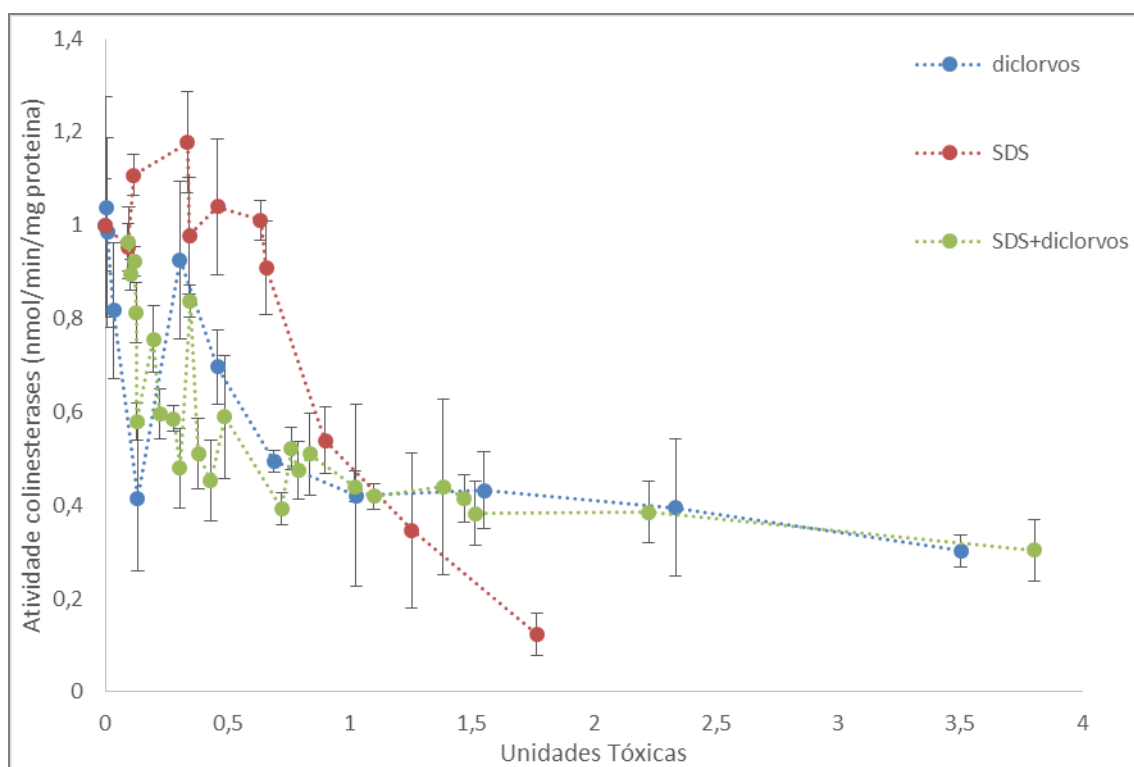


Figura 9 - Atividade média das ChEs de homogeneizados de *C. fluminea* expostos a cada um dos componentes da mistura (SDS e diclorvos) individualmente ($n = 5$) e a misturas binárias dos mesmos ($n=3$), definidas com o apoio dos modelos C.A. e I.A. (ver secção 2.3.2 e tabela 4). As barras de erro evidenciam o desvio padrão. As linhas tracejadas unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo.

A comparação da atividade de ChEs de homogeneizados totais de *C. fluminea* expostos às misturas e a doses equipotentes (T.U. equivalentes) dos seus componentes (figura 9) permite verificar que existe uma tendência para níveis de inibição superiores para as misturas em gamas de T.U. mais baixas, entre ~0,13 e ~0,5. O mesmo comportamento não se verifica para T.U. superiores, para as quais se verifica uma tendência para aproximação ao comportamento de não interação entre tóxicos.

A análise dos dados indicou que é o modelo C.A. com desvio do tipo *dose level* que apresenta um melhor ajuste aos dados experimentais (Figura 10), sendo sinalizado sinergismo da mistura a dose baixa e antagonismo a dose alta ($F= 1,087$; $p= 0,396$), o que pode ser graficamente interpretado a partir da figura 11.

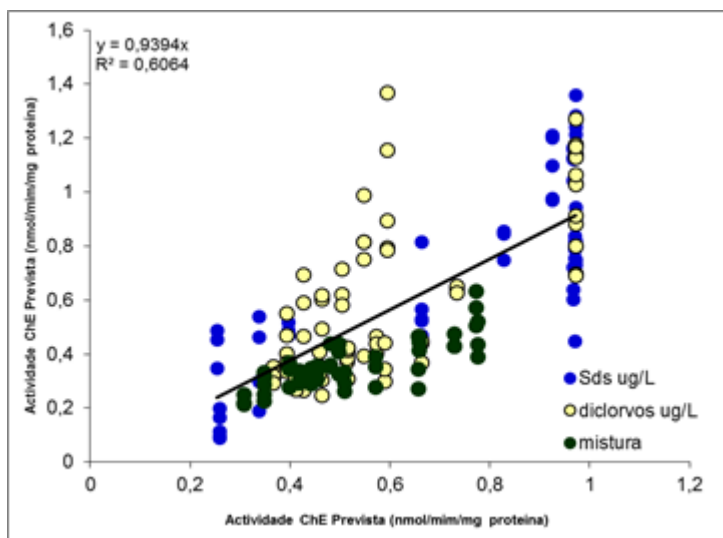


Figura 10 – Ajuste dos dados experimentais de inibição de ChEs, após exposição a misturas de diclorvos e SDS, ao modelo C.A. modificado para considerar desvios do tipo *dose level*. Os pontos relacionam o efeito observado experimentalmente com o efeito previsto pelo modelo modificado em causa e a linha representa a regressão linear estabelecida entre as duas variáveis. O R^2 é o coeficiente de determinação e constitui uma medida do quão fidedigna é a predição do comportamento da mistura pelo modelo em causa.

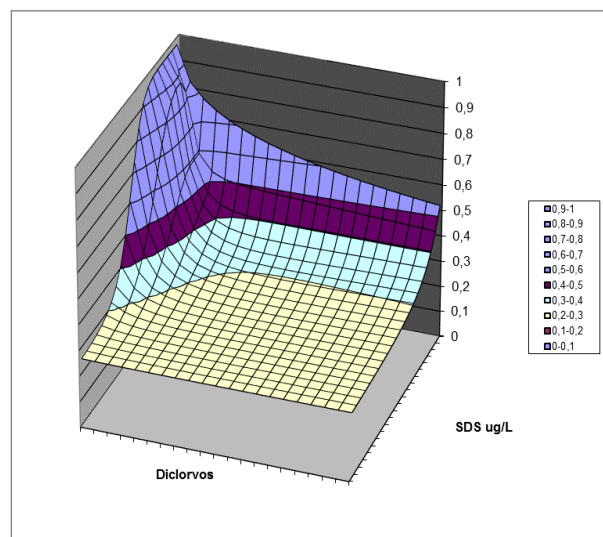


Figura 11 – Superfície de resposta construída com base nos dados experimentais dos ensaios de determinação da atividade de ChEs das misturas binárias de diclorvos/SDS. Os dados apresentados foram ajustados ao modelo C.A. com desvio do tipo *dose level*

A análise dos dados experimentais determinou que o melhor ajuste dos dados de inibição de ChE após exposição a misturas de diclorvos e SDS é obtido para o modelo C.A com desvio do tipo *dose level*.

Tal como já foi referido anteriormente efeitos sinérgicos são relativamente incomuns (Cedergreen and Streibig, 2005; Forget et al., 1999), sendo contudo relativamente comuns para combinações contendo inseticidas que atuam em ChE (Barata et al., 2006).

Os resultados obtidos por Feng et al., (2008) evidenciaram uma melhor capacidade de inibição de ChE de uma mistura contendo triclorfão e SDS após exposição de tecido muscular de *Tilapia nilótica*, tendo sido este o único trabalho acerca de efeito combinado na inibição de ChE de misturas contendo um composto organofosforado e um detergente a que tivemos acesso até a data.

3.4 Ensaios de mortalidade com misturas binárias dos compostos modelo

Tendo sido verificada uma tendência para efeitos sinérgicos no que diz respeito à capacidade de inibição de ChE, em pelo menos parte da superfície de resposta, foram

realizados novos testes de mortalidade, agora com misturas. Os tratamentos foram selecionados com base nas respostas obtidas nos ensaios de inibição da atividade de ChE *in vitro* e avaliou-se até que ponto o aumento de capacidade de inibir ChE se traduz num aumento da letalidade da mistura para a espécie em estudo. Através desta associação foi possível inferir acerca da viabilidade de utilizar ensaios alternativos, de execução mais simples e rápida, na fase de desenho e otimização de métodos de controlo melhorados envolvendo a combinação de agentes biocidas.

Os resultados destes testes de mortalidade serão apresentados e discutidos nas subsecções seguintes. Para cada uma das combinações são apresentados gráficos que indicam a mortalidade cumulativa observada em intervalos de 24 h (Figuras 15-21).

3.4.1 Mistura cobre/dimetoato em Dafenil®

A análise dos dados obtidos nos ensaios de inibição de ChEs *in vitro* com as misturas (ver secção 3.3.) indicou a existência de efeito sinérgico ao longo de toda a superfície de resposta, independente do rácio entre químicos e da dose. Por isso, caso o efeito sinérgico verificado *in vitro* se traduzisse num efeito também sinérgico da mistura sobre a mortalidade, seria viável aplicar uma quantidade reduzida de um dos componentes e fazer variar o segundo, obtendo os mesmos resultados. Esta foi a opção metodológica tomada, tendo em conta a obtenção do melhor compromisso entre a eficácia e os impactos ambientais adversos espectáveis. Uma vez que tanto o cobre como o dimetoato são compostos com alguma perigosidade ambiental, o desenho experimental adoptado contemplou dois ensaios em que se fixou um e o outro.

Os resultados apresentados na figura 12 são referentes ao teste em que se fixou uma concentração de 223 mg/L de dimetoato e se fez variar a concentração de cobre (ver tabela 6). Em simultâneo, decorreu um teste de referência em que se avaliou a mortalidade provocada por concentrações equivalentes de cobre isoladamente. Seguindo a opção metodológica adotada para esta combinação foi efetuado também um teste em que se fixou a concentração de cobre em 2,06 mg/L e se fez variar a concentração de Dimetoato (Dafenil®) ao longo de uma gama de concentrações (ver tabela 6), e o correspondente em paralelo expondo apenas à gama de concentrações de dimetoato (Dafenil®). Os resultados destes últimos ensaios são apresentados graficamente na figura 13.

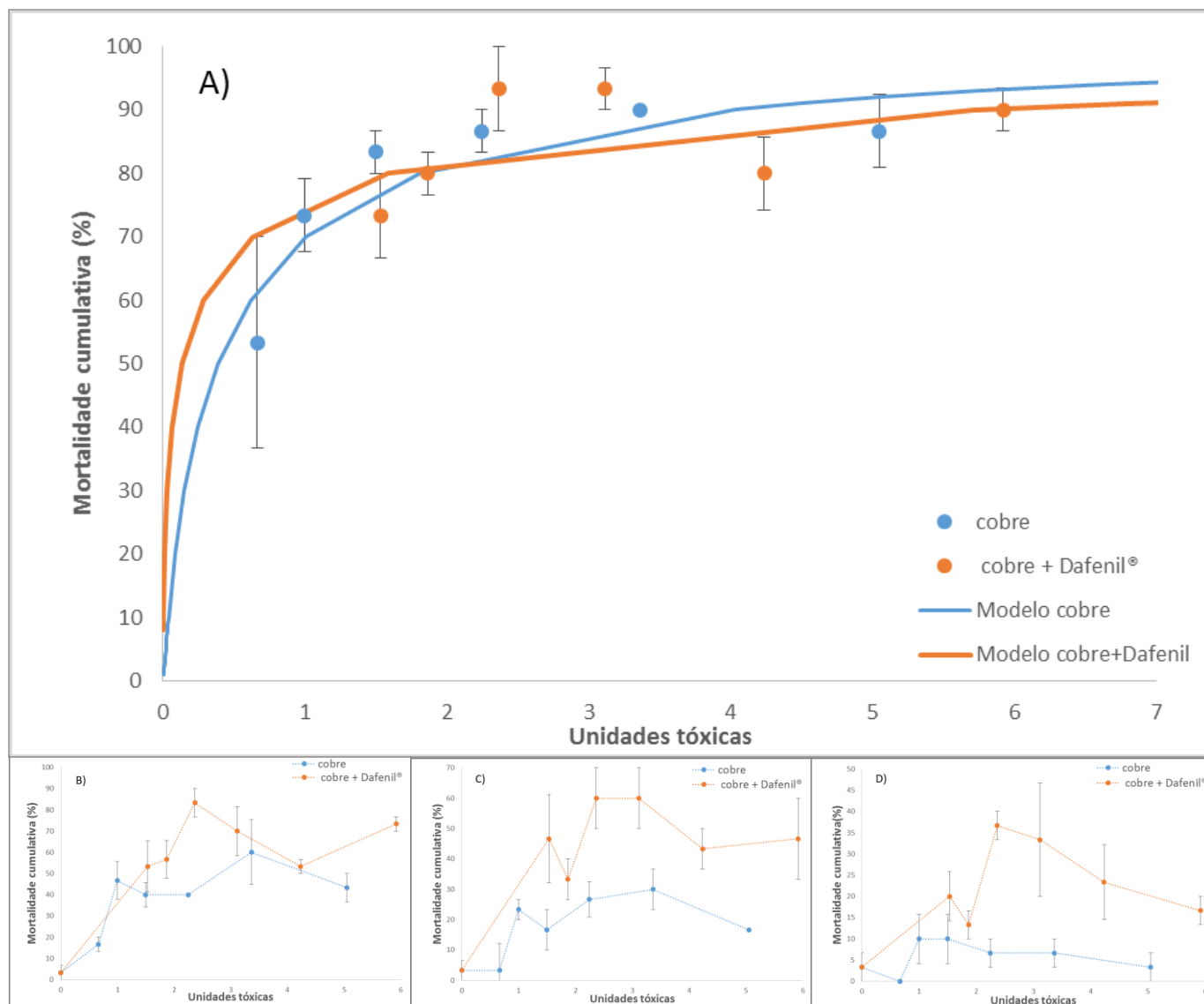


Figura 12 - Mortalidade cumulativa observada em *C. fluminea* após 96 h (A); 72 h (B); 48 h (C) e 24 h (D) de exposição a misturas com uma concentração fixa de dimetoato (Dafenil®) de 223mg/L e concentrações crescentes de cobre; paralelamente foi determinada a mortalidade cumulativa em *C. fluminea* exposta apenas a cobre. Os pontos correspondem à média de 3 réplicas (n = 10) com o respetivo erro padrão. As linhas em A correspondem ao melhor ajuste do modelo Probit aos dados experimentais obtidos. As linhas tracejadas em B-D unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo

Como se pode observar pela análise da mortalidade cumulativa após 96 h de exposição à mistura de cobre com uma concentração fixa de dimetoato (figura 12-A), a mortalidade aumenta ao longo do gradiente de concentrações tanto para o tóxico testado individualmente (cobre) como para a mistura, sendo que em ambos os casos a mortalidade máxima é de aproximadamente 90%. A mortalidade elevada verificada em ambos os casos atesta então do potencial letal tanto do cobre como da mistura testada. A análise da progressão da mortalidade ao longo do tempo, expressa nos vários gráficos incluídos na figura 12, permite observar que as percentagens de mortalidade aumentam com o aumento do tempo de exposição, tanto para o caso da mistura como para o do cobre

individualmente. Note-se ainda assim que a mortalidade varia pouco nas últimas 24 h de exposição (Figura 12-B), especialmente no caso da mistura. A análise dos gráficos das figuras 12-C e 12-D permite verificar que, para tempos de exposição relativamente pequenos (48 e 24 h respetivamente), a mistura não só parece ser bastante mais tóxica do que concentrações equipotentes de cobre testado individualmente, como os valores de mortalidade registados são já relativamente altos (máximo de ~ 60 % após 48h; máximo ~ 35% após 24h).

A tabela 10 sintetiza os valores de LC₅₀ e de LC₉₉ estimados para as exposições à combinação de cobre com dimetoato (Dafenil®). A semelhança entre os valores de LC₅₀ e LC₉₉ estimados para a exposição por 96h a cobre isoladamente e à mistura de cobre com 223 mg/L de dimetoato (Dafenil®), bem como a sobreposição dos intervalos de confiança, evidenciam que a toxicidade da mistura é equivalente à toxicidade do cobre individualmente. Estes valores de referência de toxicidade confirmam a tendência que parece identificar-se na figura 12-A no sentido de uma eficácia equivalente entre a mistura e o cobre quando actua isoladamente para concentrações equipotentes. Contudo, considerando os dados relativos à mortalidade cumulativa após 72 h de exposição, é clara a maior toxicidade da mistura (LC_x completamente distintos, sem sobreposição de intervalos de confiança; Tabela 10). Tal como para as 96h de exposição, também para as 72h estes valores de referência de toxicidade confirma o que já se destacava na representação gráfica dos resultados (Figura 12-B), ou seja, uma tendência para um comportamento sinérgico dos dois componentes da mistura quando se utiliza uma concentração fixa de dimetoato, em particular para níveis de T.U. mais baixos. Neste caso em particular, a mortalidade após 72h parece então ser o parâmetro que mais claramente permite avaliar as diferenças entre o efeito tóxico da mistura e do composto individualmente, já que às 96h a magnitude do efeito tóxico já se torna demasiado elevada para permitir resolução na avaliação de eventuais diferenças entre as abordagens (mistura vs composto individual). As diferenças de toxicidade entre mistura e composto isolado são ainda mais evidentes se considerarmos a mortalidade às 48 e 24h (Figuras 12-C e 12-D), o que atesta não só do potencial sinérgico dos dois compostos em mistura mas também da elevada toxicidade e potencial biocida da mesma.

Tabela 10 Valores de LC_x (para x = 50 e 99; T.U.) de referência obtidos por análise Probit da mortalidade cumulativa de cada um dos tratamentos (n=30) em cada um dos ensaios em que se expôs *C. fluminea* por 72 e por 96 h a cobre e à combinação deste com dimetoato (Dafenil®) a uma concentração fixa de 223 mg/L. Os valores apresentados entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95% obtidos para cada estimativa.

| Combinações | LC ₅₀ (IC 95%); T.U. | | LC ₉₉ (IC 95%); T.U. | |
|----------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|---------------------|
| | 96 h | 72 h | 96 h | 72 h |
| Cobre | 0,57 (0,22-0,84) | 3,90 (3,30-4,86) | 6,02 (5,29-7,06) | 15,55 (12,41-21,38) |
| Cobre + dimetoato 223 mg/L | 0,76 (0,31-1,10) | 2,04 (1,54-2,45) | 6,73 (5,99-7,78) | 1,25 (0,69-1,70) |

A análise da mortalidade ao longo do período experimental, e particularmente para as 24 horas após o início do teste (figura 12-D), evidencia uma tendência para maior eficácia de concentrações mais baixas especialmente no caso da mistura, o que poderá estar relacionado com a já referida capacidade de detetar compostos químicos na água que têm sido atribuída a algumas espécies de bivalves (Cooper and Bidwell, 2006; Harrison et al., 1984) e que poderá ocorrer também para a amêijoia asiática. O organismo teste não será capaz de detetar concentrações mais baixas dos compostos, ficando assim mais vulnerável à sua ação biocida; outra explicação seria o eventual aumento da eficácia de mecanismos

de destoxificação, que pode ser estimulado pela presença de alguns tóxicos (Binelli et al., 2006; Livingstone, 1998).

Na segunda abordagem à presente combinação de biocidas, fixou-se a concentração de cobre presente na mistura, tendo feito variar a concentração de dimetoato (Dafenil®) (ver tabela 9); os resultados obtidos estão representados graficamente na figura 13.

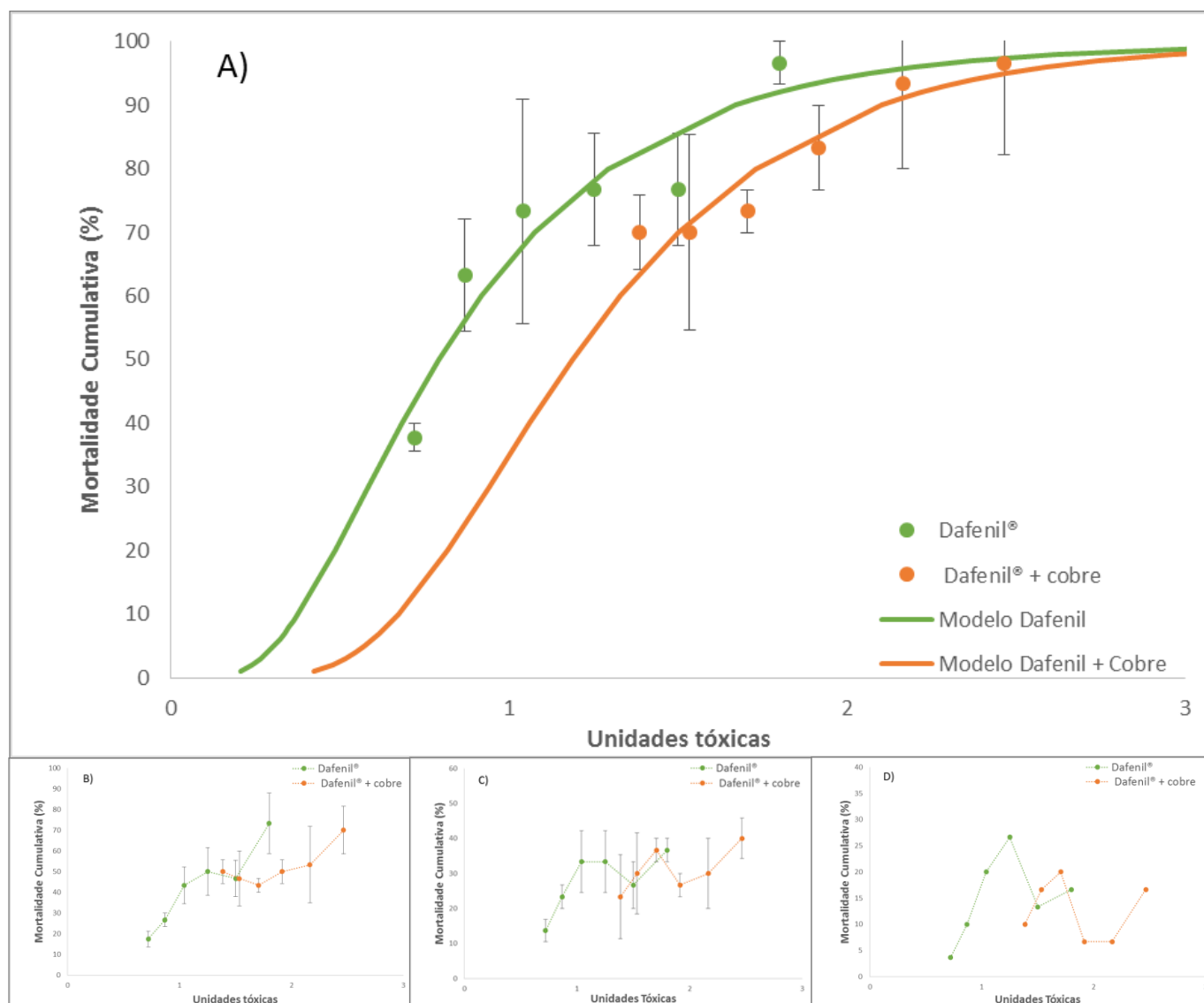


Figura 13 - Mortalidade cumulativa observada em *C. fluminea* após 96 h (A); 72 h (B); 48 h (C) e 24 h (D) de exposição a misturas com uma concentração fixa de cobre de 2,06 mg/L e concentrações crescentes de dimetoato; paralelamente foi determinada a mortalidade cumulativa em *C. fluminea* exposta apenas a dimetoato. Os pontos correspondem à média de 3 réplicas (n = 10) com o respetivo erro padrão. As linhas em A correspondem ao melhor ajuste do modelo Probit aos dados experimentais obtidos. As linhas tracejadas (B a D) unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo.

Ao contrário do que se verificou para a abordagem anterior, nesta os dados evidenciam uma tendência para um efeito menos do que aditivo. Como se pode observar pela análise direta do gráfico da figura 13-A, é possível identificar uma tendência para menor toxicidade da mistura, em relação à exposição isolada a dimetoato (Dafenil®), de resto um comportamento que se manteve ao longo de todo o período experimental.

O comportamento dos tóxicos em mistura foi sinérgico para toda a curva dose-resposta no que respeita à capacidade de inibição de ChEs, o que não se traduz no comportamento verificado quando se considera a mortalidade como parâmetro de toxicidade. Possíveis explicações para esta discrepância são a utilização de um parâmetro de toxicidade complexo e altamente integrador, a mortalidade, que dificulta o estabelecimento de relações estreitas entre o mecanismo de ação principal de um dos componentes da mistura (a inibição de colinesterases) e a resposta desse mesmo parâmetro. A outra possível explicação é o facto de o dimetoato requerer bioativação em ometoato (Jokanovic, 2001), que é um composto muito mais tóxico (Syberg et al., 2008). É possível que a proporção de ometoato a que são sujeitas as ChEs em cada um dos casos sejam diferentes. Considerando que a bioativação poderá ocorrer em menor proporção nas condições dos ensaios *in vitro*, a toxicidade do composto nestas condições seria menor. Tendo em conta que a existência de efeito sinérgico foi determinada com base nos resultados dos testes *in vitro*, quando o rácio dimetoato/ometoato é presumivelmente menor do que nas condições *in vivo*, é possível que um aumento da toxicidade inerente ao aumento da quantidade de ometoato presente quando o tempo de exposição aumenta (ensaios *in vivo*) possa alterar o comportamento tóxico da mistura. Este será um típico exemplo de discordância no comportamento de químicos em mistura quando parâmetros intrinsecamente distintos são comparados.

Não obstante, a análise das figuras 7 e 8 permitem verificar que embora exista sinergismo ao longo de toda a superfície de resposta (atividade de ChEs) da mistura, este sinergismo é mais evidente para doses baixas. Considerando que um aumento da proporção de ometoato implica um aumento da toxicidade da mistura, que é comparável a um aumento da dose, é possível que o efeito sinérgico se anule quando se avalia mortalidade como parecem sugerir os dados experimentais. Isto explicaria a maior concordância (tendência para sinergismo) entre os efeitos verificados ao nível da inibição das ChEs e a mortalidade quando a quantidade de dimetoato presente na mistura é menor, ou seja, no contexto da primeira abordagem, em que se fixa uma concentração relativamente baixa de dimetoato (223 mg/L) e se faz variar a concentração de cobre. Quando as concentrações de dimetoato são maiores (ver tabela 6), a mistura evidencia uma tendência para um efeito letal combinado menos do que aditivo (Figura 13), não consistente com o comportamento sinérgico observado *in vitro*.

A avaliação da mortalidade em cada um dos momentos em que foi registada permite observar que, em alguns casos, é aparente uma eficácia menor das concentrações mais altas testadas, tanto no caso das misturas como no caso do dimetoato (Dafenil®) individualmente, o que é consistente com o comportamento de evitamento atribuído a algumas espécies de bivalves (Cooper and Bidwell, 2006) ; outra explicação seria o eventual aumento da eficácia de mecanismos de destoxificação, que pode ser estimulado pela presença de alguns tóxicos (Binelli et al., 2006; Livingstone, 1998). Dado que o dimetoato é um composto neurotóxico, e que por isso poderá influenciar funções baseadas

na atividade muscular (incluindo a abertura e fecho das valvas ou a integração de sentidos químicos), é possível que haja um descontrolo crescente da capacidade de evitamento por parte do organismo à medida que aumenta a concentração do biocida na exposição. De facto, esta hipótese que é consistente com os dados obtidos no presente trabalho já que, quando aumenta o tempo de exposição, deixa de ser reconhecível a maior eficácia relativa de doses mais baixas de dimetoato (Dafenil®).

3.4.2 Mistura SDS/diclorvos

A análise dos dados obtidos nos ensaios de inibição de ChEs *in vitro* para misturas contendo SDS e diclorvos (ver secção 3.3.) indicou a existência de efeito sinérgico, com desvio do tipo *dose level*. Tendo em conta estes resultados, que assinalaram que o efeito sinérgico obtido no que diz respeito à atividade de ChEs se devia sobretudo ao diclorvos, optou-se por fixar uma de duas concentrações de diclorvos (0,2 e 1 mg/L) e fazer variar a concentração de SDS (ver tabela 7) para os ensaios de mortalidade. Dada a elevada perigosidade ambiental do diclorvos, e tendo em conta que bastou a presença de diclorvos em concentrações muito baixas na mistura diclorvos/SDS para promover efeitos sinérgicos apreciáveis na atividade de ChEs, foram selecionadas as concentrações mais baixas de diclorvos que promoviam inibição significativa da atividade das colinesterases após exposição à mistura diclorvos/SDS.

Os resultados apresentados na Figura 14 são referentes a um ensaio onde se fixou uma concentração de 0,2 mg/L de diclorvos e se fez variar a concentração de SDS presente na mistura (ver tabela 7). Ao mesmo tempo, foi efetuado um teste usando as mesmas concentrações de SDS mas agora combinadas com diclorvos à concentração de 1 mg/L, cujos resultados se encontram representados graficamente na figura 15. Em simultâneo decorreu ainda um terceiro teste em que os organismos foram expostos a SDS isoladamente e que permite a comparação de eficácia de misturas e SDS isoladamente (figuras 14 e 15).

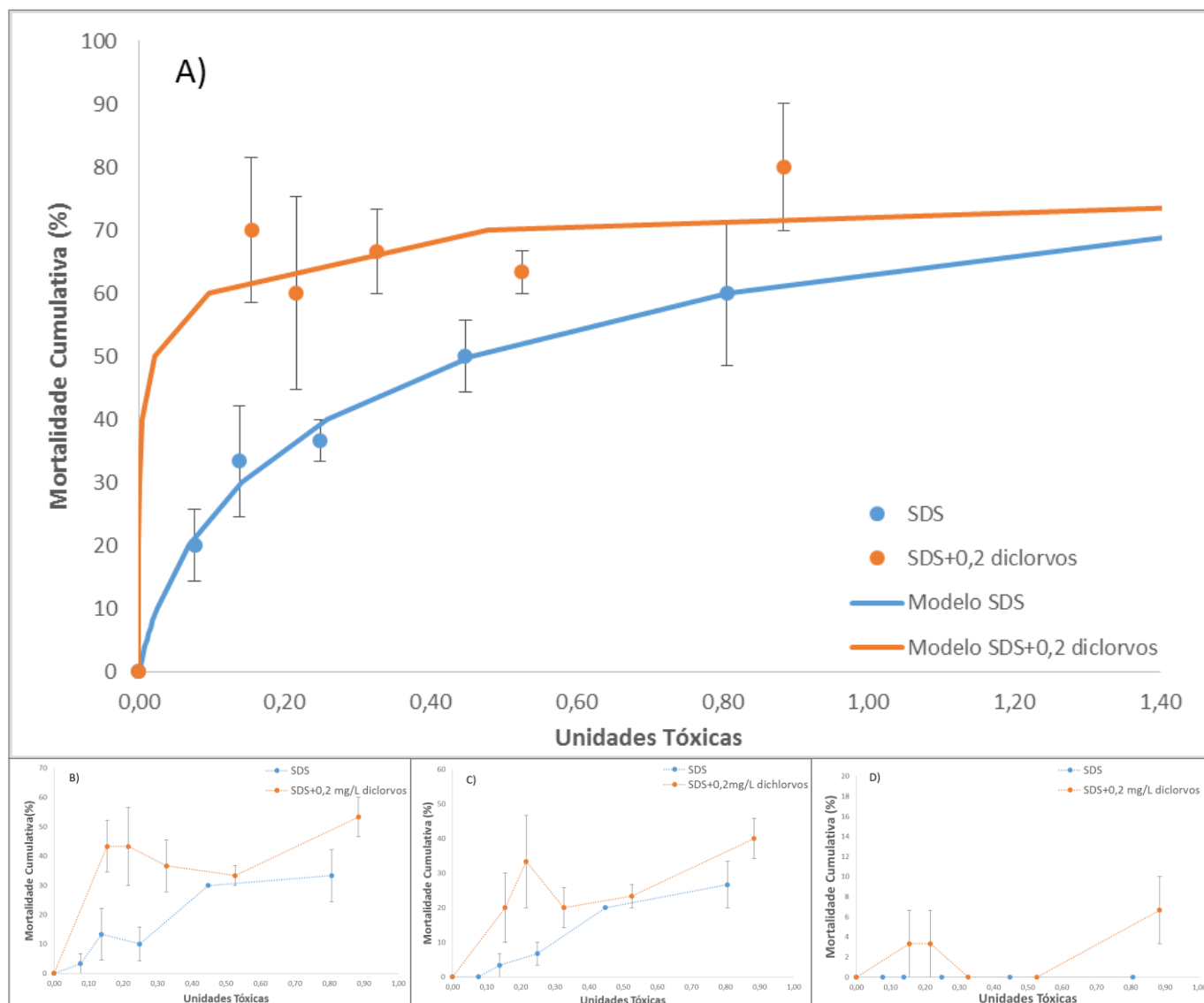


Figura 14 - Mortalidade cumulativa observada em *C. fluminea* após 96 h (A); 72 h (B); 48 h (C) e 24 h (D) de exposição a misturas com uma concentração fixa de 0,2 mg/L de diclorvos e concentrações crescentes de SDS; paralelamente foi determinada a mortalidade cumulativa em *C. fluminea* exposta apenas a SDS. Os pontos correspondem à média de 3 réplicas (n = 10) com o respectivo erro padrão. As linhas correspondem ao melhor ajuste do modelo Probit aos dados experimentais obtidos (figura 14-A). As linhas tracejadas unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo

A figura 14-A indica que, após 96h de exposição, a mortalidade aumentou ao longo do gradiente de concentrações, atingindo um máximo de ~80 % no caso da mistura e de ~60% no caso do SDS isoladamente. Tendo em conta que o objetivo último da utilização destes compostos no contexto da presente dissertação é o controlo da amêijoia asiática, seria conveniente que a mortalidade induzida fosse a mais alta possível. Tendo em conta os níveis de mortalidade relativamente baixos que se observaram no caso da exposição singular a SDS (~ 60%), a utilização deste composto isoladamente como método de controlo poderá não se apresentar como uma solução adequada. O mesmo não acontece se considerarmos a ação da mistura, capaz de provocar mortalidade de cerca de 80%, e que por isso aparentemente se apresenta como melhor alternativa para o controlo desta peste.

A mortalidade aumentou ao longo do tempo de exposição (Figura 14-E a 14-A) de forma consistente, tanto no caso da mistura como no caso do SDS individualmente. Para todos os tempos de exposição, foi sempre a mistura que apresentou maior potencial como agente de controlo, visto que a mortalidade obtida quando se expõem os animais a misturas contendo os dois tóxicos é sempre superior à observada para concentrações equipotentes de SDS dosado individualmente. Esta interpretação gráfica é confirmada pelos valores de LC_x estimados para cada ensaio realizado (Tabela 9), que assinalam também uma maior eficácia da mistura relativamente ao SDS dosado isoladamente.

Os efeitos sinérgicos observados na atividade das ChEs após exposição *in vitro* a tratamentos combinados de diclorvos e SDS foram mais fortes a baixas concentrações (figura 10 e 11), tendência que parece manter-se para os ensaios de mortalidade, já que o incremento de mortalidade causada pela mistura comparativamente à mortalidade causada por concentrações equipotentes do composto individual é aparentemente maior para concentrações mais baixas.

Uma outra tendência pode ser notada quando se compara a mortalidade obtida para os testes com a combinação de diclorvos e SDS com aquela que foi obtida nos testes com a combinação dimetoato e cobre: e aponta no sentido de que aparentemente haverá uma menor influência do comportamento de evitamento que é sugerido que possa ocorrer nesta espécie (Cooper and Bidwell, 2006), ou de outros fatores disposicionais que possam explicar a maior eficácia relativa de misturas menos concentradas (e por isso teoricamente menos tóxicas), nomeadamente a já referida potencial estimulação da ação de esterases que na prática funcionam como mecanismo de destoxificação (Anderson et al., 1988). Este será sempre um fator importante para a escolha de eventuais métodos de controlo químico pois pode condicionar a eficácia de qualquer químico ou mistura de químicos.

A análise dos resultados obtidos às 96 h de exposição no teste em que a concentração fixa de diclorvos foi aumentada para 1 mg/L (figura 15-A) permite verificar que a mortalidade aumenta ao longo do gradiente de concentrações, atingindo um máximo de ~60% para o SDS isoladamente e de 100 % para o caso da mistura. Em ambos os casos se verificou o potencial letal dos compostos testados, contudo a mortalidade máxima induzida pelo SDS isoladamente é relativamente baixa para a gama de concentrações testada. Já a mistura apresentou valores de mortalidade próximos de 100% em toda a gama de concentrações testada, revelando-se mais promissora como eventual método de controlo. Concordantemente, os valores de LC_x estimados denotam claramente a maior toxicidade da mistura, não ocorrendo sobreposição de intervalos de confiança (Tabela 9).

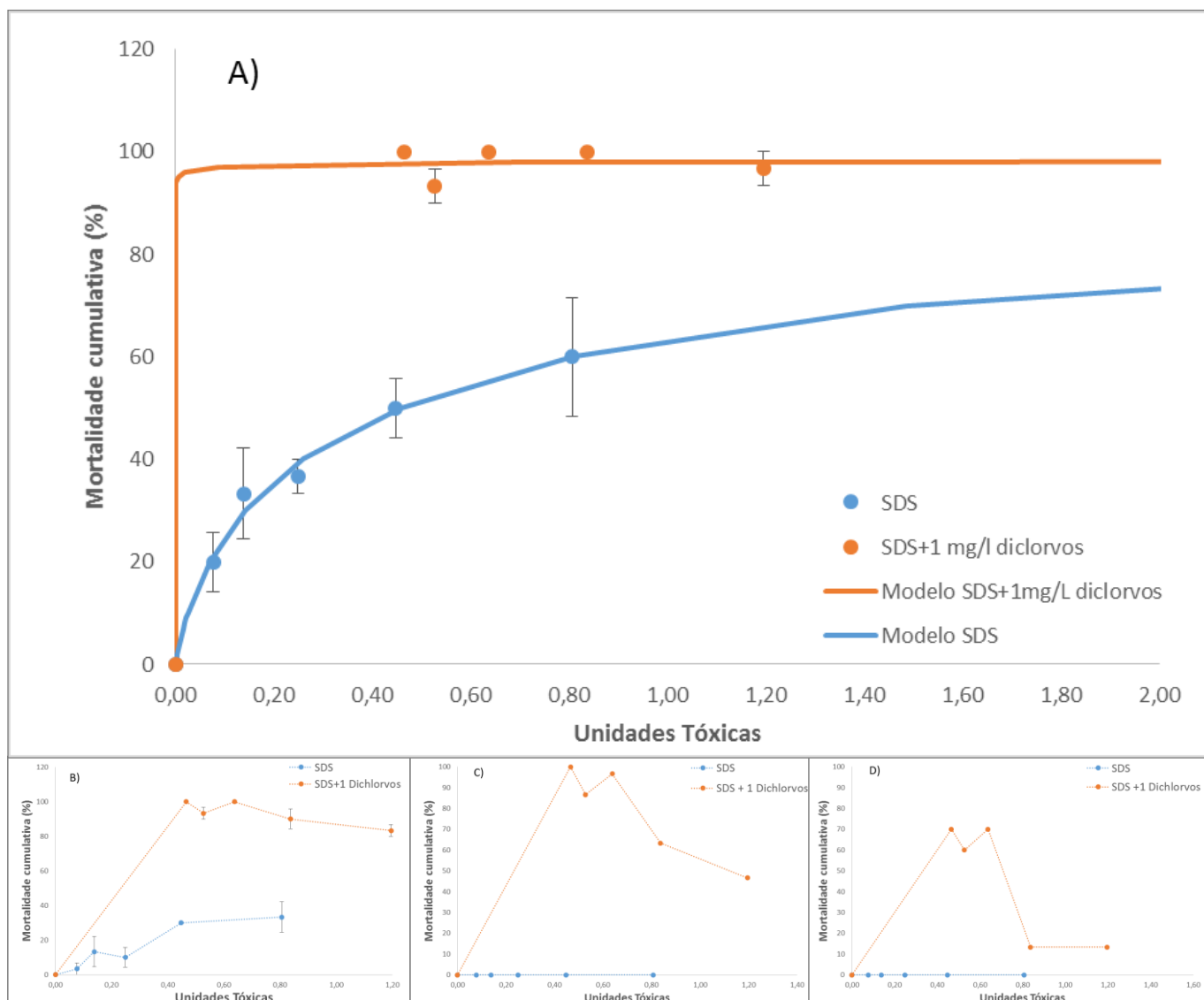


Figura 15 - Mortalidade cumulativa observada em *C. fluminea* após 96h (A); 72h (B); 48h (C) e 24h (D) de exposição a misturas com uma concentração fixa de 1 mg/L de diclorvos e concentrações crescentes de SDS; paralelamente foi determinada a mortalidade cumulativa em *C. fluminea* exposta apenas a SDS. Os pontos correspondem à média de 3 réplicas (n = 10) com o respetivo erro padrão. As linhas em A correspondem ao melhor ajuste do modelo Probit aos dados experimentais obtidos. As linhas tracejadas (B-D) unem as médias dos valores obtidos experimentalmente e não representam portando o ajuste de nenhum modelo preditivo.

Tabela 11 Valores de LCx (para x = 50 e 99; T.U.) de referência obtidos por análise Probit da mortalidade cumulativa de cada um dos tratamentos (n=30) em cada um dos ensaios em que se expôs *C. fluminea* por 96 h a SDS e a combinações deste com diclorvos. Os valores apresentados entre parêntesis correspondem ao intervalo de confiança a 95% obtidos para cada estimativa

| Combinações | 96 h - LC ₅₀ (IC 95%); T.U. | 96 h - LC ₉₉ (IC 95%); T.U. |
|--------------------------|--|--|
| SDS | 0,55 (0,48-0,64) | 1,82 (1,55-2,26) |
| SDS + diclorvos 0,2 mg/L | 0,24 (0,17-0,30) | 1,58 (1,34-1,97) |
| SDS + diclorvos 1 mg/L | 0,25 (0,20-0,29) | 0,71 (0,66-0,78) |

A comparação dos LC obtidos nos dois testes de mortalidade onde se avaliou o potencial letal de misturas de SDS/diclorvos (Tabela 11), demonstra ganhos na mortalidade quando se aumenta a concentração de diclorvos. Os dados experimentais (Figura 15) confirmam esta tendência já que a mortalidade máxima operada pela mistura com 0,2 mg/L de diclorvos era já considerável (cerca de 80%), mas aumenta para a mistura que contém 1mg/L de diclorvos; neste último caso, mesmo após apenas 24 h de exposição (figura 15-D), a mortalidade é já bastante elevada, chegando a valores de cerca de 80% em alguns tratamentos. A comparação dos efeitos causados por misturas contendo concentrações diferentes de diclorvos permite que se tenha uma noção da concentração de diclorvos mínima capaz de despoletar um efeito sinérgico da mistura. A avaliação dos resultados obtidos permite observar que, é provavelmente possível utilizar uma concentração intermédia (entre os 0,2 e 1 mg/L usados), estabelecendo assim um compromisso entre a eficácia do método de controlo (sinergismo relevante da mistura) e os potenciais efeitos ambientais nefastos decorrentes do uso de compostos químicos deste tipo. A análise da variação da mortalidade ao longo do período experimental (figura 15) permitiu verificar que em todos os momentos de avaliação da mortalidade, a mistura se apresentou como mais tóxica do que o composto individual para concentrações equipotentes, o que reforça a evidência de um comportamento mais do que aditivo dos compostos presentes na mistura. É particularmente relevante a já referida alta mortalidade verificada 24h após a contaminação (figura 15-D) especialmente se considerarmos que para concentrações equipotentes de SDS não ocorreu mortalidade dos animais expostos. Tal diferença ilustra o aumento do potencial letal da mistura presumivelmente associado a um efeito sinérgico entre os compostos da mistura. A análise dos gráficos das figuras 15-C e 15-D evidenciam ainda uma tendência para menor eficácia de misturas com valor de T.U. superiores, o que mais uma vez poderá estar relacionado com a capacidade que alguns bivalves têm de detetar alguns compostos na água, fechando as valvas como mecanismo de evitamento (Cooper and Bidwell, 2006). Contudo, e porque os compostos organofosforados são neurotóxicos, poderão impactar afetar a capacidade de fechar as valvas. Este efeito foi observado por McHenery et al. (1997) para *Mytilus edulis* exposto a diclorvos, sendo que a importância deste efeito poderá diminuir com o tempo de exposição. Compostos organofosforados podem ainda interferir com o mecanismo de quimiorreção de alguns organismos (Moretto and Lotti, 1998; Tierney et al., 2010), e esta interferência poderá condicionar a eventual resposta de evitamento por fecho das valvas, assim contribuindo para um efeito aumentado dos compostos quando em mistura. Esta aparente menor eficácia relativa de concentrações mais elevadas dos tóxicos poderá finalmente estar também relacionada também com outros mecanismos disposicionais, de que é exemplo um aumento da capacidade de destoxificação que pode ocorrer na presença de alguns tóxicos (Binelli et al., 2006; Livingstone, 1998).

Os resultados obtidos no teste de mortalidade após exposição a diclorvos individualmente permitem algumas considerações relativamente ao eventual aumento da eficácia da mistura. A comparação dos LC de referência obtidos com base nos resultados da exposição individual a diclorvos (ver tabela 8) revela que as concentrações de diclorvos utilizadas em mistura não seriam capazes de provocar mortalidade considerável para efeitos de controlo se aplicados isoladamente. Considerando o LC₉₉, que é um parâmetro adequado para avaliar a capacidade de controlo de um determinado composto (6,02 mg/L (5,57- 6,58) para exposição individual a diclorvos; Tabela 8), as concentrações de diclorvos usadas em mistura (0,2 mg/L e 1 mg/L) não seriam capazes de causar mortalidade significativa em *C. fluminea* se aplicadas individualmente.

4. Considerações finais

O trabalho realizado teve como objetivo principal a avaliação do potencial do uso do biomarcador atividade colinesterásica, e da sua potencial relação com a mortalidade provocada por compostos anticolinesterásicos, como forma de prever o potencial biocida de misturas binária de agentes químicos de controlo para a amêijoia asiática *C. fluminea*. Os agentes químicos de controlo considerados foram criteriosamente selecionados de forma a que a relação acima mencionada pudesse ser plausível, ou seja, as misturas testadas envolveram um composto anticolinesterásico e um segundo que, não sendo primariamente um anticolinesterásico, tinha capacidade comprovada para inibir colinesterases. Os resultados obtidos evidenciam que o uso do biomarcador poderá ser bastante útil, uma vez que com um desenho experimental relativamente simples foi possível identificar rapidamente combinações que poderiam ter um efeito biocida incrementado face a cada componente da mistura dosado individualmente. Adicionalmente, validou-se esta resposta com sucesso em testes de mortalidade posteriormente desenvolvidos, com um desenho experimental simplificado e logisticamente exequível face ao que seria necessário se se implementassem ensaios de mortalidade para testar um desenho completo de misturas.

Neste trabalho optamos pela utilização de misturas em que apenas um dos constituintes é um inibidor específico de ChE. Esta opção permitia testar o conceito metodológico central (utilização de ensaios simplificados para o estudo do potencial biocida de misturas) envolvendo agentes de controlo desenhados para afetar alvos fisiológicos que não aquele em que se baseia o ensaio alternativo selecionado (inibição *in vitro* da atividade de colinesterases). Apesar de esta opção abrir o leque de condições de validação do modelo metodológico estudado, acarreta implicações na possibilidade de estabelecer uma relação direta entre inibição de ChE e mortalidade. Se esta relação é linear para inibidores específicos de ChEs, como o dimetoato e diclorvos, tal não acontece para compostos com mecanismos de ação tóxica mais diversa (como o cobre e o SDS). Há ainda a ressalvar que a escolha dos anticolinesterásicos a usar neste trabalho adiciona significativamente a esta variação pretendida para as condições de teste do modelo metodológico estudado: enquanto o dimetoato requer bioativação para potenciar a sua atividade anticolinesterásica, o que interfere com o estabelecimento de relações entre os efeitos observados *in vitro* e *in vivo*, o diclorvos atua diretamente sobre as ChE, “linearizando” essa análise. Assim, a utilização de dimetoato combinado com cobre poderá ser visto como o pior dos cenários no que respeita à eventual correspondência entre efeitos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos neste trabalho permitem então uma visão otimista relativamente à aplicabilidade do modelo metodológico estudado a misturas contendo compostos com atividade anticolinesterásica, mesmo quando a relação entre o biomarcador usado, a atividade de ChEs, e a mortalidade não é muito evidente. Tendo em conta que o modelo metodológico funcionou em condições não ideais, isto é, quando a relação entre o biomarcador atividade de ChE é menos evidente, é expectável que funcione ainda melhor em situações em que o biomarcador selecionado como alternativa à mortalidade esteja diretamente relacionado com o modo de ação tóxica letal dos compostos envolvidos.

A utilização de compostos com atividade anticolinesterásica acarreta alguns problemas que foram várias vezes referidos ao longo deste trabalho. Neste contexto, é de

assinalar a sua baixa especificidade, ou seja, são compostos cujo modo de ação tóxico se aplica a grande parte do biota (Tabela 11 e não apenas ao organismo-alvo, neste caso a peste a controlar. Podendo ser olhado como um problema, esta característica têm também o seu lado positivo: dado que os métodos de controlo químico de pestes são aplicados na larga maioria dos casos em sistemas fechados ou semi-fechados, a inespecificidade dos agentes de controlo em causa permite que a abordagem estudada possa ser aplicada na melhoria de métodos de controlo de várias outras pestes. Deve ainda ressaltar-se que a regulamentação ambiental exige que haja cuidados na composição dos efluentes industriais que são lançados nos sistemas naturais. Assim, todos os efluentes industriais que transportam resíduos de químicos utilizados nos sistemas de produção ou em sistemas paralelos (como é o de controlo de *biofoulers*) têm que ser tratados antes de serem descarregados no ambiente. Tendo em conta este cenário, a utilização de compostos de degradação rápida (como os agentes organofosforados) ou de fácil tratamento (Beltran and Pocsidio, 2010) para controlar *macrofoulers* como a amêijoia asiática ou outros *biofoulers*, é interessante porque, em princípio, será ambientalmente mais favorável. Nesta perspetiva sublinha-se, por fim, a necessidade de cautela na comparação entre as concentrações dos compostos testados (individualmente, mas sobretudo em mistura) capazes de induzir níveis apreciáveis de controlo de *C. fluminea* e as concentrações que induzem efeitos nefastos em organismos não alvo (alguns exemplos podem ser encontrados na tabela 12, já que as concentrações de descarga serão substancialmente mais baixas do que as concentrações de dosagem.

Tabela 12 Resumo de parâmetros toxicológicos estimados em exposições de várias espécies de animais aos compostos modelo utilizados neste trabalhobibliográficas.

| Composto | Organismo | Parâmetro | Referência |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| Diclorvos | <i>Daphnia pulex</i> | LC ₅₀ (48h) = 0,07 µg/L | Johnson and Finley (1980) |
| | <i>Palaemonetes vulgaris</i> | LC ₅₀ (48h) = 300 µg/L | Eisler (1969) |
| | <i>Gallus domesticus</i> | LD ₅₀ (21d) = 6,5 mg/kg | Schafer & Brunton (1979) |
| | Rato | LD ₅₀ (96h) = 87 mg/kg | Sasinovich (1968) |
| | <i>Pteronarcys californica</i> | LC ₅₀ (96h) = 0,043 mg/L | Johnson and Finley (1980) |
| Dimetoato | Rato | LD ₅₀ = 247 mg/kg | Edson and Noakes (1960) |
| | <i>Physa acuta</i> | LC ₅₀ (96h) = 27,2 mg/L | Liwarska-Bizukojc et al. (2005) |
| SDS | <i>Artemia salina</i> | LC ₅₀ (96h) = 36,58 mg/L | Liwarska-Bizukojc et al. (2005) |
| | <i>Daphnia magna</i> | LC ₅₀ (96h) = 25 mg/L | Martínez-Jerónimo and García-González (1994) |
| | <i>Juga plecifera</i> | LC ₅₀ (48h) = 0,07 µg/L | Nebeker et al. (1986) |
| Cobre | <i>Daphnia magna</i> | LC ₅₀ (24h) = 380 µg/L | Ferrando et al., (1992) |
| | <i>Oncorhynchus kitsch</i> | LC ₅₀ (24h) = 380 µg/L | Buhl and Hamilton, (1990) |

Por todas as razões exploradas no decorrer do presente trabalho parece-nos evidente o potencial do uso do biomarcador atividade de ChEs para acelerar o desenvolvimento de métodos de controlo mais eficazes e/ou ambientalmente menos danosos baseados na combinação de vários compostos com atividade anticolinesterásica. Dado o sucesso que o modelo metodológico exibiu com as combinações analisadas, e tendo em conta o valor das

combinações de químicos enquanto estratégia de melhoramento de métodos de controlo de *biofouling*, justifica-se plenamente sugerir trabalho futuro na sua validação com combinações diferentes e/ou utilizando outros biomarcadores de substituição da mortalidade para efeitos preditivos.

5. Bibliografia

- (WHO), W.H.O., 1989. Environmental health criteria for dichlorvos.
- Aldridge, D., McMahon, R., 1978. Growth, fecundity, and bioenergetics in a natural population of the asiatic freshwater clam, *Corbicula manilensis philippi*, from north central Texas. *Journal of Molluscan Studies* 44, 49-70.
- Aldridge, D.C., Elliott, P., Moggridge, G.D., 2006. Microencapsulated BioBullets for the control of biofouling zebra mussels. *Environmental Science & Technology* 40, 975-979.
- Anderson, R.S., Durst, H.D., Landis, W.G., 1988. Organofluorophosphate-hydrolyzing activity in an estuarine clam, *Rangia cuneata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 91, 575-578.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M.A., 1993. The asiatic clam *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) (Bivalvia, *corbiculidae*) in Europe. *American Malacological Bulletin* 10, 39-49.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2348-2356.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology* 78, 1-14.
- Beltran, K.S., Pocsidio, G.N., 2010. Acetylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Mull., as a biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanauan River, Philippines. *Environmental Monitoring and Assessment* 165, 331-340.
- Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy. *Pharmacological Reviews* 41, 93-141.
- Beusen, J.M., Neven, B., 1989a. Toxicity of dimethoate to *Daphnia magna* and fresh water fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 126-133.
- Bidwell, J.R., Farris, J.L., Cherry, D.S., 1995. Comparative response of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the asian clam, *Corbicula fluminea*, to dgh/quat, a nonoxidizing molluscicide. *Aquatic Toxicology* 33, 183-200.
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2006. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62, 510-519.

- Bocquené, G., Galgani, F., 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone - choice of a method for detection of effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22, 337-344.
- Bolton-Warberg, M., Coen, L.D., Weinstein, J.E., 2007. Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: Laboratory and field studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 207-216.
- Broderius, S.J., Kahl, M.D., Hoglund, M.D., 1995. Use of joint toxic response to define the primary-mode of toxic action for diverse industrial organic-chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1591-1605.
- Buhl, K.J., Hamilton, S.J., 1990. Comparative toxicity of inorganic contaminants released by placer mining to early life stages of salmonids. *Ecotoxicology and environmental safety* 20, 325-342.
- Buratti, F.A., Testai, E., 2007. Evidences for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver. *Toxicology* 241, 33-46.
- Byrne, M., Phelps, H., Church, T., Adair, V., Selvakumaraswamy, P., Potts, J., 2000. Reproduction and development of the freshwater clam *Corbicula australis* in southeast Australia. *Hydrobiologia* 418, 185-197.
- Bódis, E., Tóth, B., Sousa, R., 2013. Massive mortality of invasive bivalves as a potential resource subsidy for the adjacent terrestrial food web. *Hydrobiologia*, 1-10.
- Caffrey, J.M., Evers, S., Millane, M., Moran, H., 2011. Current status of Ireland's newest invasive species - the Asian clam *Corbicula fluminea* (Muller, 1774). *Aquatic Invasions* 6, 291-299.
- Campagna, A.F., Eler, M.N., Espindola, E.L.G., Senhorini, J.A., do Rego, R.F., Silva, L.O.L., 2006. Dimethoate 40% organophosphorous pesticide toxicity in *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae, Characiformes) eggs and larvae. *Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia* 66, 633-640.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1676-1683.
- Chainho, P., Costa, J.L., Chaves, M.L., Lane, M.F., Dauer, D.M., Costa, M.J., 2006. Seasonal and spatial patterns of distribution of subtidal benthic invertebrate communities in the Mondego River, Portugal - a poikilohaline estuary. *Hydrobiologia* 555, 59-74.
- Cheng, W., Wang, C.H., 2001. The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate stress. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 137-144.

- Claudi, R., Prescott, H.T., Prescott, L.K., Mastitsky, E.S., Evans, D., Taraborelli, C., 2012a. Evaluating high pH for control of *dreissenid* mussels. International journal of applied research on biological invasions.
- Claudi, R., Prescott, T.H., Mastitsky, S., Evans, D., Taraborelli, A.C., 2012b. Evaluating Low pH for Control of Zebra Mussels, in: Consulting, R. (Ed.).
- Colautti, R.I., MacIsaac, H.J., 2004. A neutral terminology to define 'invasive' species. Diversity and Distributions 10, 135-141.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquatic Toxicology 76, 258-267.
- Corsi, I., Pastore, A.M., Lodde, A., Palmerini, E., Castagnolo, L., Focardi, S., 2007. Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia : Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, 413-419.
- Costa, R., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. Journal of Applied Ecology 45, 1712-1721.
- Costa, R., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2012. Multicomponent molluscicide mixtures for zebra mussel control. Journal of Great Lakes Research 38, 317-325.
- Costa, R., Pereira, J.L., Gomes, J., Goncalves, F., Hunkeler, D., Rasteiro, M.G., 2014. The effects of acrylamide polyelectrolytes on aquatic organisms: Relating toxicity to chain architecture. Chemosphere 112, 177-184.
- DAISIE, 2014. European Invasive Alien Species Gateway (<http://www.europe-aliens.org/>)
- Dauberschmidt, C., Dietrich, D.R., Schlatter, C., 1997. Investigations on the biotransformation capacity of organophosphates in the mollusc *Dreissena polymorpha* P. Aquatic toxicology 37, 283-294.
- Davis, M.A., 2009. Invasion Biology. Oxford University Press.
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. Pest Management Science 56, 516-520.
- Denhartog, C., Vandenbrink, F.W.B., Vandervelde, G., 1992. Why was the invasion of the river rhine by *Corophium curvispinum* and *Corbicula* species so successful. Journal of Natural History 26, 1121-1129.
- Doherty, F.G., 1990. The asiatic clam, *Corbicula spp*, as a biological monitor in freshwater environments. Environmental Monitoring and Assessment 15, 143-181.

- Doherty, F.G., Farris, J.L., Cherry, D.S., Cairns Jr, J., 1986. Control of the freshwater fouling bivalve *Corbicula fluminea* by halogenation. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 15, 535-542.
- Edson, E.F., Noakes, D.N., 1960. The comparative toxicity of six organophosphorus insecticides in the rat. Toxicology and applied pharmacology 2, 523-539.
- Eisler, R., 1969. Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustaceans. Crustaceana, 302-310.
- Escartín, E., Porte, C., 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. Ecotoxicology and Environmental Safety 34, 160-164.
- Escartín, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 2090-2095.
- Feng, T., Li, Z.B., Guo, X.Q., Guo, J.P., 2008. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro. Pesticide Biochemistry and Physiology 92, 107-113.
- Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., Fernández-Casalderrey, A., 1992. Relative sensitivity of *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* to five pesticides. Journal of Environmental Science & Health Part B 27, 511-522.
- Forget, J., Pavillon, J.F., Beliaeff, B., Bocquené, G., 1999. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). Environmental Toxicology and Chemistry 18, 912-918.
- Franco, J.N., Ceia, F.R., Patricio, J., Modesto, V., Thompson, J., Marques, J.C., Neto, J.M., 2012. Population dynamics of *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) in mesohaline and oligohaline habitats: Invasion success in a Southern Europe estuary. Estuarine Coastal and Shelf Science 112, 31-39.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. Biomarkers 10, 360-375.
- Frasco, M.F., Guilhermino, L., 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. Fish Physiology and Biochemistry 26, 149-156.
- French, J.R.P., 1993. How well can fishes prey on zebra mussels in eastern north-america. Fisheries 18, 13-19.
- Fuller, S.L.H., Britton, J.C., 1980. The freshwater bivalve Mollusca (Unionidae, Sphaeriidae, *Corbiculidae*) of the Savannah river plant, South Carolina. Doe's Savannah river plant national environment research park.

- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 37-45.
- Gabriel, R., 2011. Monitorização e controlo da amêijoia asiática, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), Departamento de engenharia química. Universidade de Coimbra.
- Gabriel, R., Ré, A., Gonçalves, F., Costa, R., Pereira, J., 2013. Monitorização e controlo da amêijoia invasora *Corbicula fluminea* em indústrias hidro-dependentes. *Captar*, pp. 92-112.
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 61, 169-180.
- Gomes, J., Pereira, J.L., Rosa, I.C., Saraiva, P.M., Gonçalves, F., Costa, R., 2014. Evaluation of candidate biocides to control the biofouling Asian clam in the drinking water treatment industry: An environmentally friendly approach. *Journal of Great Lakes Research* 40, 421-428.
- Graney, R.L., Giesy, J.P., 1988. Alterations in the oxygen consumption, condition index and concentration of free amino acids in *Corbicula fluminea* (Mollusca, Pelecypoda) exposed to sodium dodecyl sulfate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 301-315.
- Groten, J.P., Feron, V.J., Suhnel, J., 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 316-322.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Total Environment* 247, 137-141.
- Hakenkamp, C.C., Palmer, M.A., 1999. Introduced bivalves in freshwater ecosystems: the impact of *Corbicula* on organic matter dynamics in a sandy stream. *Oecologia* 119, 445-451.
- Harrison, F., Knezovich, J., Rice, D., Jr., 1984a. The toxicity of copper to the adult and early life stages of the freshwater clam, *Corbicula manilensis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 85-92.
- Harrison, F.L., Knezovich, J.P., Rice, D.W., 1984b. The toxicity of copper to the adult and early life stages of the freshwater clam, *Corbicula manilensis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 85-92.

- Hedtke, S.M., Stanger-Hall, K., Baker, R.J., Hillis, D.M., 2008. All-male asexuality: Origin and maintenance of androgenesis in the asian clam corbicula. *Evolution* 62, 1119-1136.
- Henager, C.H., Jonhson, K.I., Page, T.L., 1983. Engineering factors influencing *Corbicula* fouling in nuclear-service Water systems
- Hyytiainen, K., Lehtiniemi, M., Niemi, J.K., Tikka, K., 2013. An optimization framework for addressing aquatic invasive species. *Ecological Economics* 91, 69-79.
- Ilarri, M., Souza, A., Modesto, V., Guilhermino, L., Sousa, R., 2014. (in press). Differences in the macrozoobenthic fauna colonising empty bivalve shells before and after invasion by *Corbicula fluminea*. *Marine & Freshwater Research*
- Ilarri, M.I., Freitas, F., Costa-Dias, S., Antunes, C., Guilhermino, L., Sousa, R., 2012. Associated macrozoobenthos with the invasive Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Sea Research* 72, 113-120.
- Ismail, N.S., Müller, C.E., Morgan, R.R., Luthy, R.G., 2014. Uptake of Contaminants of Emerging Concern by the Bivalves *Anodonta californiensis* and *Corbicula fluminea*. *Environmental science & technology* 48, 9211-9219.
- Johnson, W.W., Finley, M.T., 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78. United States Fish and Wildlife Service Resource Publication.
- Jokanovic, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139-160.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2701-2713.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2005. Contrasting distribution and impacts of two freshwater exotic suspension feeders, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems* 47, 239-262.
- Kraemer, L.R., Galloway, M.L., 1986. Larval development of *Corbicula fluminea* (Muller) (Bivalvia, Corbiculacea) - an appraisal of its heterochrony. *American Malacological Bulletin* 4, 61-79.
- Kumar, S., Pandey, R.K., Das, S., Das, V.K., 2013. Temperature dependent mortality and behavioral changes in a freshwater mussel *Lamellidens marginalis* to dimethoate exposure. *Journal of Environmental Biology* 34, 165-170.

- LeBris, H., Maffart, P., Bocquené, G., Buchet, V., Galgani, F., Blanc, G., 1995. Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture* 138, 139-144.
- Lehtonen, K.K., Leinio, S., 2003. Effects of exposure to copper and malathion on metallothionein levels and acetylcholinesterase activity of the mussel *Mytilus edulis* and the clam *Macoma balthica* from the northern Baltic sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 489-496.
- Letelier, M.E., Lepe, A.M., Faúndez, M., Salazar, J., Marín, R., Aracena, P., Speisky, H., 2005. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 151, 71-82.
- Lima, D., Roque, G.M., Almeida, E.A., 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research* 91, 45-51.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 43-49.
- Liawska-Bizukojc, E., Miksch, K., Malachowska-Jutcz, A., Kalka, J., 2005. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere* 58, 1249-1253.
- Louie, A.Y., Meade, T.J., 1999. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chemical reviews* 99, 2711-2734.
- Ludke, J.L., Hill, E.F., Dieter, M.P., 1975. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Archives of environmental contamination and toxicology* 3, 1-21.
- Lundebye, A.K., Curtis, T.M., Braven, J., Depledge, M.H., 1997. Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology* 40, 23-36.
- Mack, A., Robitzki, A., 2000. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5 butyrylcholinesterase-DNA study. *Progress in Neurobiology* 60, 607-628.
- Mackie, G.L., Claudi, R., 2010. *Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems* (Second Edition ed.). United States of America: CRC Press.
- Mahar, A.M., Watzin, M.C., 2005. Effects of metal and organophosphate mixtures on *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1579-1586.

- Martínez-Jerónimo, F., García-González, R., 1994. Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 3, 247-253.
- McMahon, R.F., 2000. Invasive characteristics of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Nonindigenous Freshwater Organisms*, 315-343.
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1235-1244.
- Meehan, S., Shannon, A., Gruber, B., M. Rackl, S., E. Lucy, F., 2014. Ecotoxicological impact of Zequanox®, a novel biocide, on selected non-target Irish aquatic species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 148-153.
- Mills, E.L., Rosenberg, G., Spidle, A.P., Ludyanskiy, M., Pligin, Y., May, B., 1996. A Review of the Biology and Ecology of the Quagga Mussel (*Dreissena bugensis*), a Second Species of Freshwater Dreissenid Introduced to North America. *American Zoologist* 36, 271-286.
- Minchin, D., Lucy, F., Sullivan, M., 2002. Zebra Mussel: Impacts and Spread, in: Leppäkoski, E., Gollasch, S., Olenin, S. (Eds.), *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Springer Netherlands, pp. 135-146.
- Monteiro, S.M., Oliveira, E., Fontainhas-Fernandes, A., Sousa, M., 2012. Effects of Sublethal and Lethal Copper Concentrations on the Gill Epithelium Ultrastructure of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Zoological Studies* 51, 977-987.
- Morais, P., 2009. The Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the Guadiana River Basin(southwestern Iberian Peninsula): Setting the record straight, in: Teodósio, J., Reis, J., Chícharo, M.A., Chícharo, L. (Eds.).
- Moretto, A., Lotti, M., 1998. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 64, 463-468.
- Mouthon, J., 2001. Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia : Corbiculidae) in the Saone River at Lyon (France). *Hydrobiologia* 452, 109-119.
- Nagel, K., 1989. Ein weiterer Fundort von *Corbicula fluminalis* (Müller 1774) (Mollusca:Bivalvia) in Portugal. *Mitteilungen der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft*, p. 17.
- Nebeker, A.V., Stinchfield, A., Savonen, C., Chapman, G.A., 1986. Effects of copper, nickel and zinc on three species of Oregon freshwater snails. *Environmental toxicology and chemistry* 5, 807-811.
- Noellgen, R.M., Landis, W.G., 1992. Identification and characterization of the organophosphate acid anhydrase activity of the blue mussel, *Mytilus edulis*.

Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology 101, 615-623.

Nunes, B., 2011. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 212. Springer, New York, pp. 29-59.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 20, 369-376.

OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test.

Phelps, H.L., 1994. The asiatic clam (*Corbicula fluminea*) invasion and system-level ecological change in the potomac river estuary near washington, DC. Estuaries 17, 614-621.

Pimentel, D., Pimentel, M., Wilson, A., 2007. Plant, Animal, and Microbe Invasive Species in the United States and World, in: Nentwig, W. (Ed.), Biological Invasions. Springer Berlin Heidelberg, pp. 315-330.

Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecological Economics 52, 273-288.

Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. Fish & Shellfish Immunology 5, 581-595.

Pope, C.N., 1999. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews 2, 161-181.

Prezant, R.S., Chalermwat, K., 1984. Flotation of the bivalve *Corbicula fluminea* as a means of dispersal. Science 225, 1491-1493.

Pérez-Quintero, J.C., 2008. Revision of the distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1744) in the Iberian Peninsula. Aquatic Invasions, pp. 355-358.

Ramos, A.S., Goncalves, F., Antunes, S.C., Nunes, B., 2012. Cholinesterase characterization in *Corbicula fluminea* and effects of relevant environmental contaminants: A pesticide (chlorfenvinphos) and a detergent (SDS). Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes 47, 512-519.

Reis, J., 2006. Atlas dos Bivalves de Água Doce em Portugal Continental Instituto Conservação da Natureza.

- Reyna, P.B., Moran, A.G., Tatian, M., 2013. Taxonomy, distribution and population structure of invasive *Corbiculidae* (Mollusca, Bivalvia) in the Suquia River basin, Cordoba, Argentina. *Iheringia Serie Zoologia* 103, 77-84.
- Roberts, T.R., Hutson, D.H., Royal Society of Chemistry . Information, S., 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and fungicides. Royal Society of Chemistry.
- Robertson, J.L., Russel, R.M., Savin, N.E., 1980. A user's guide to Probit Or LOGit analysis. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station.
- Robinson, J.V., Wellborn, G.A., 1988. Ecological resistance to the invasion of a freshwater clam, *Corbicula fluminea*: fish predation effects. *Oecologia* 77, 445-452.
- Rosa, I.C., Costa, R., Gonçalves, F., Pereira, J.L., 2014a. Bioremediation of Metal-Rich Effluents: Could the Invasive Bivalve *Corbicula fluminea* Work as a Biofilter? *J. Environ. Qual.* 43, 1536-1545.
- Rosa, I.C., Pereira, J.L., Costa, R., Gomes, J., Pereira, M.d.L., Goncalves, F., 2014b. Dispersal of *Corbicula fluminea*: factors influencing the invasive clam's drifting behavior. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 50, 37-47.
- Rosa, I.C., Pereira, J.L., Costa, R., Goncalves, F., Prezant, R., 2012. Effects of Upper-Limit Water Temperatures on the Dispersal of the Asian Clam *Corbicula fluminea*. *Plos One* 7.
- Rosa, I.C., Pereira, J.L., Gomes, J., Saraiva, P.M., Gonçalves, F., Costa, R., 2011. The Asian clam *Corbicula fluminea* in the European freshwater-dependent industry: A latent threat or a friendly enemy? *Ecological Economics* 70, 1805-1813.
- Satyaparameshwar, K., Reddy, T.R., Kumar, N.V., 2006. Study of carbohydrate metabolism in selected tissues of freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* under copper sulphate toxicity. *Journal of Environmental Biology* 27, 39-41.
- Schlenk, D., Gollon, J.L., Griffin, B.R., 1998. Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 390-396.
- Silva, V., 2012. Contamination by wildfires runoff: effects of biofiltration, Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro.
- Simard, M.A., Paquet, A., Jutras, C., Robitaille, Y., Blier, P.U., Courtois, R., Martel, A.L., 2012. North American range extension of the invasive Asian clam in a St. Lawrence River power station thermal plume. *Aquatic Invasions* 7, 81-89.
- Singh, P., Singh, V.K., Singh, D.K., 2005. Effect of binary combination of some plant-derived molluscicides with MGK-264 or piperonyl butoxide on the reproduction of the snail *Lymnaea acuminata*. *Pest Management Science* 61, 204-208.

- Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., Iwahashi, H., 2004. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research* 38, 61-70.
- Song, M.Y., Stark, J.D., Brown, J.J., 1997. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2494-2500.
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2006. Factors influencing the occurrence and distribution of *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) in the River Lima estuary. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 42, 165-171.
- Sousa, R., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008a. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 44, 85-94.
- Sousa, R., Gutierrez, J.L., Aldridge, D.C., 2009. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biological Invasions* 11, 2367-2385.
- Sousa, R., Nogueira, A.J.A., Gaspar, M.B., Antunes, C., Guilhermino, L., 2008b. Growth and extremely high production of the non-indigenous invasive species *Corbicula fluminea* (Muller, 1774): Possible implications for ecosystem functioning. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80, 289-295.
- Sousa, R., Novais, A., Costa, R., Strayer, D.L., 2013. Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia*, 1-19.
- Spaccesi, F., 2013. Abundance, recruitment, and shell growth of the exotic mussel *Limnoperna fortunei* in the Rio de la Plata (Argentina). *Zoological Studies* 52, 1.
- Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 428-436.
- Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L., Kennedy, C.J., 2010. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic toxicology* 96, 2-26.
- vanderWerf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture Ecosystems & Environment* 60, 81-96.
- Varó, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 48, 563-569.
- Varó, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 75, 61-72.

- Varó, I., Navarro, J.C., Nunes, B., Guilhermino, L., 2007a. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture* 266, 87-96.
- Varó, I., Nunes, B., Amat, F., Torreblanca, A., Guilhermino, L., Navarro, J.C., 2007b. Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquatic Living Resources* 20, 263-270.
- Vaughn, C.C., Hakenkamp, C.C., 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 46, 1431-1446.
- Vila, M., Basnou, C., Pysek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Nentwig, W., Olenin, S., Roques, A., Roy, D., Hulme, P.E., Andriopoulos, P., Arianoutsou, M., Augustin, S., Bacher, S., Bazos, I., Bretagnolle, F., Chiron, F., Clergeau, P., Cochard, P.-O., Cocquempot, C., Coeur d'Acier, A., David, M., Delipetrou, P., Desprez-Loustau, M.-L., Didziulis, V., Dorkeld, F., Essl, F., Galil, B.S., Gasquez, J., Georgioui, K., Hejda, M., Jarosik, V., Kark, S., Kokkoris, I., Kuhn, I., Lambdon, P.W., Lopez-Vaamonde, C., Marcer, A., Migeon, A., McLoughlin, M., Minchin, D., Navajas, M., Panov, V.E., Pascal, M., Pergl, J., Perglova, I., Pino, J., Poboljsaj, K., Rabitsch, W., Rasplus, J.-Y., Sauvard, D., Scalera, R., Sedlacek, O., Shirley, S., Winter, M., Yannitsaros, A., Yart, A., Zagatti, P., Zikos, A., Partners, D., 2010. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment* 8, 135-144.
- Vohmann, A., Borcharding, J., Kureck, A., bij de Vaate, A., Arndt, H., Weitere, M., 2010. Strong body mass decrease of the invasive clam *Corbicula fluminea* during summer. *Biological Invasions* 12, 53-64.
- Weitere, M., Vohmann, A., Schulz, N., Linn, C., Dietrich, D., Arndt, H., 2009. Linking environmental warming to the fitness of the invasive clam *Corbicula fluminea*. *Global Change Biology* 15, 2838-2851.
- Werner, S., Rothhaupt, K.O., 2007. Effects of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* on settling juveniles and other benthic taxa. *Journal of the North American Benthological Society* 26, 673-680.
- Wittmann, M.E., Chandra, S., Reuter, J.E., Caires, A., Schladow, S.G., Denton, M., 2012. Harvesting an invasive bivalve in a large natural lake: species recovery and impacts on native benthic macroinvertebrate community structure in Lake Tahoe, USA. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* 22, 588-597.
- Wong, P.P.K., Chu, L.M., Wong, C.K., 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environment International* 25, 417-422.
- Yin, Y.H., Carter, C.W., 1996. Incomplete factorial and response surface methods in experimental design: Yield optimization of tRNA(Trp) from in vitro T7 RNA polymerase transcription. *Nucleic Acids Research* 24, 1279-1286.